

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Nuevas aproximaciones basadas en técnicas ómicas para la
evaluación de los mecanismos de toxicidad de
contaminantes alimentarios y ambientales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Estefanía García Calvo

DIRECTOR

José Luis Luque García

Madrid

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de C.C. Químicas

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**NUEVAS APROXIMACIONES BASADAS EN
TÉCNICAS ÓMICAS PARA LA EVALUACIÓN DE
LOS MECANISMOS DE TOXICIDAD DE
CONTAMINANTES ALIMENTARIOS Y
AMBIENTALES**

AUTORA
Estefanía García Calvo

DIRECTOR
José Luis Luque García

Madrid 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. ESTEFANÍA GARCÍA CALVO,
estudiante en el Programa de Doctorado DE QUÍMICA AVANZADA,
de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

NUEVAS APROXIMACIONES BASADAS EN TÉCNICAS ÓMICAS PARA LA EVALUACIÓN DE
LOS MECANISMOS DE TOXICIDAD DE CONTAMINANTES ALIMENTARIOS Y AMBIENTALES

y dirigida por: JOSÉ LUIS LUQUE GARCÍA

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 12 de julio de 2019

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



Ciudad Universitaria
28040 Madrid (España)
Teléfono: 913944160

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

José Luis Luque García, Profesor del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas y Director de la Unidad de Espectrometría de Masas de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA QUE:

El presente trabajo titulado “NUEVAS APROXIMACIONES BASADAS EN TÉCNICAS ÓMICAS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE TOXICIDAD DE CONTAMINANTES ALIMENTARIOS Y AMBIENTALES” ha sido realizado en el Departamento de Química Analítica de la UCM, bajo mi dirección, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora, Dña. Estefanía García Calvo

Y para que así conste, firmo en Madrid, a 12 de Julio de 2019.

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser 'J. Luque', con una línea horizontal extendida debajo.

Prof. José Luis Luque García

A mi Abuelo

*“Aprende como si fueras a vivir toda la vida
y vive como si fueras a morir mañana”*

(Charles Chaplin)

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no vería la luz sin la ayuda y colaboración de muchas personas que me han acompañado en el día a día de las diferentes etapas del mismo. Todas ellas merecen unas palabras de reconocimiento.

En primer lugar, a mi director de Tesis, José L. Luque García por la confianza depositada en mí, por la paciencia, por darme unas bases científicas lo suficientemente sólidas como para desarrollar esta Tesis Doctoral, por enseñarme lo bonita y útil que es la Ciencia y por ser el mejor referente a seguir. Pero sobre todo, por ser mucho más que un simple jefe, porque no me cansaré de agradecerle a la vida que cruzara nuestros caminos en mi segundo año de carrera, por estar ahí en los malos momentos, y especialmente en todos los ratos buenos que no podría resumir con tan pocas palabras y que espero sigamos viviendo juntos.

A Héctor, por compartir conmigo esta bonita experiencia, por tus diseños y, en especial, por demostrar con un simple abrazo el apoyo en miles de situaciones agradables de la vida y en otras que no lo son tanto. A Cristina porque, al igual que a Héctor, la palabra compañero os queda corta, por crear un ambiente envidiable y convertiros, en gran parte, en el motivo de venir a trabajar con una sonrisa en la cara. Y cómo no acordarme del resto de QBA, de Andrés que juntos hemos trabajado desde que entró en el grupo y espero que siga siendo así durante todo su doctorado, y Guille porque es muy bonito sentirse parte de un grupo de investigación del que aprender y con el que poder contar.

Al grupo de investigación de determinación de trazas, especiación y proteómica, incluidos profesores y doctorandos, por el apoyo, por escuchar una y mil veces en que consistía un experimento SILAC. Y en particular a Carmen Cámara que, aunque hoy estará disfrutando la vida, ella lideraba este grupo de investigación cuando comencé este trabajo. A compañeros que ya no están con nosotros y con los que he trabajado y aprendido a lo largo de este periodo: Pablo, Mari, Sandra, Javi García, Javier Espadas, Carlos, Noe, Irene, Mabel. A Sandra Jiménez porque está muy infravalorado ir por los pasillos como las locas, saludar con una sonrisa y que te la devuelvan, gracias por estar ahí. Y a los que vinieron a hacer estancias aportando siempre una visión diferente de

la Ciencia, en especial a Nerea por ser la mujer con el corazón más grande de Oviedo y una gran amiga, a Pelayo y a la familia por hacerme sentir siempre como en casa.

A la Unidad de Espectrometría de Masas de la UCM por permitir completar mi formación con el conocimiento de una de las instrumentaciones analíticas más complejas, utilizadas y valoradas en el mundo de la Química Analítica.

Como no, a mis AMIGOS: Jorge, Vanesa, Alba, Ana, Víctor, Augusto y Manuel con doble motivo, porque las noches de fiestas desenfundadas vienen muy bien para despejar la mente, y porque toda una vida juntos no justifica el hecho de que os esté hablando de cosas que no entendéis y encima tengáis que poner cara de que os interesa. Al recientemente incorporado Manu por los años que nos quedan juntos. A Elisa y Rafaela por ser de lo mejor que me llevo de mi grado universitario, y aunque a veces la vida nos lleva por caminos separados los viajes siempre vuelven a unirnos.

A mi FAMILIA y amigos de la familia, Juanto, Pili, a mis tíos y primos, Ana, Juanma, Marcial, por estar orgullosos de lo que hago, aunque algunos no sepáis bien ni qué he estudiado, por saber que siempre habéis estado a mi lado y siempre lo estaréis. A Javier por seguir el camino de la Ciencia y por poder decir con orgullo que eres mi primo.

A Aina, porque más que tú no me ha aguantado nadie, por ayudarme dando tu visión de este trabajo y de todos los que he ido realizando, pero sobre todo por formar parte de mi vida, de mi día a día y por darme un motivo para ser feliz durante tantos años. Y a tu familia, en especial a Ana por su apoyo y cariño.

Finalmente, a mi hermano Sergio porque discutir tanto contigo hace más especiales los momentos de risa y porque sé que siempre puedo contar contigo. Y a mis padres, por apoyarme en todo lo que he querido hacer en la vida, por priorizar mi formación por encima de todo, por permitirme estudiar lo que me gusta y trabajar duro para que eso fuera posible, y sobre todo enseñarme que nadie te regala nada, que con esfuerzo se consigue todo, y que la felicidad se alcanza con pequeñas cosas, pero sobre todo cuando son felices las personas que quieres.

ÍNDICE

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
RESUMEN/SUMMARY	XVII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Estudios de toxicidad convencionales.....	5
2. Relevancia de las técnicas ómicas en el análisis toxicológico	7
3. Nanopartículas: Quantum dots	12
4. Compuestos metálicos: Metilmercurio	18
5. Compuestos orgánicos: Surfynol	26
OBJETIVOS.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1. Cultivo celular	35
2. Ensayo de viabilidad celular.....	36
2. a Condiciones de exposición a QDs.....	37
2. b Condiciones de exposición a Surfynol.....	37
3. Microscopía de epifluorescencia	37
4. Microscopía electrónica de transmisión.....	38
5. Citometría de flujo.....	39
5. a Evaluación del ciclo celular	39
5. b Ensayo de apoptosis	39
6. Proteómica cuantitativa.....	40
6. a Stable isotopic labeling by amino acids in cell culture (SILAC).....	40
6. a. 1 Marcaje metabólico	41
6. a. 2 Lisis celular.....	42
6. a. 3 Separación electroforética	42
6. a. 4 Digestión en gel.....	43
6. a. 5 Análisis por nanocromatografía de líquidos y espectrometría de masas.....	44
6. a. 6 Análisis de datos y estudios estadísticos	45

6. b	Super-SILAC	46
6. b. 1.	Exposición de larvas de pez cebra a QDs.....	47
6. b. 2.	Aislamiento de proteínas de larvas de pez cebra	48
6. b. 3.	Marcaje metabólico y lisis celular. Obtención de la mezcla super-SILAC	48
6. b. 4.	Identificación y cuantificación de proteínas	48
7.	Metabolómica no dirigida	50
7. a	Extracción de metabolitos.....	51
7. b	Derivatización	52
7. c	Análisis mediante GC-TOF.....	52
7. d	Análisis de datos y estudios estadísticos	53
8.	Metabolómica dirigida	53
8. a	Extracción de ATP, ADP, NADH, NAD ⁺	54
8. b	Análisis mediante LC-ESI-QQQ-MS.....	55
8. c	Análisis de datos y estudios estadísticos	56
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		57
I. ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE LOS QDs DE CdSe/ZnS		61
I. 1	Resultados	63
I. 1. a	Estudio de viabilidad celular	63
I. 1. b	Estudio de internalización celular y localización en orgánulos.....	66
I. 1. c	Perfil del ciclo celular	69
I. 1. d	Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en células HepG2 expuestas a QDs de CdSe/ZnS.....	71
I. 1. e	Optimización del método de extracción de proteínas de larvas de pez cebra..	75
I. 1. f	Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en larvas de pez cebra expuestas a QDs de CdSe/ZnS	80
I. 2	Discusión.....	82
II. ESTUDIOS DE TOXICIDAD DEL MeHg.....		91
II. 1	Resultados	93
II. 1. a	Optimización del método de extracción de metabolitos de un cultivo celular	93
II. 1. b	Metabolómica no dirigida de células expuestas a MeHg	96
II. 1. c	Metabolómica no dirigida de células expuestas a MeHg-Se(IV).....	100
II. 1. d	Análisis quimiométrico de los resultados de metabolómica no dirigida de células expuestas a MeHg y MeHg-Se(IV)	101

II. 1. e	Optimización del método de metabolómica dirigida para la determinación de ATP, ADP, NADH y NAD ⁺ procedente de un cultivo celular.....	103
II. 1. f	Metabolómica dirigida.....	111
II. 2	Discusión	113
III.	ESTUDIOS DE TOXICIDAD DEL SURFYNOL	121
III. 1	Resultados.....	123
III. 1. a	Estudios previos.....	123
III. 1. b	Estudio de viabilidad celular.....	124
III. 1. c	Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en células NTERA2 expuestas a Surfynol.....	125
III. 1. d	Metabolómica no dirigida	132
III. 1. e	Metabolómica dirigida.....	136
III. 1. f	Estudio de viabilidad en células somáticas.....	137
III. 1. g	Estudio de apoptosis celular	138
III. 2	Discusión	139
	CONCLUSIONES.....	149
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
	ANEXO I: TÉCNICAS BIOANALÍTICAS	185
I. 1	Ensayo de viabilidad celular	187
I. 2	Microscopía de contraste de fases y de epifluorescencia.....	188
I. 3	Microscopía electrónica de transmisión	190
I. 4	Citometría de flujo	191
I. 4. a	Ciclo celular.....	192
I. 4. b	Ensayo de apoptosis	193
I. 5	SDS-PAGE	194
I. 6	Espectrometría de masas.....	195
I. 6. a	Fuentes de ionización	196
I. 6. b	Analizadores de masas	200
I. 6. c	Detectores.....	204
I. 7	Proteómica cuantitativa	205
I. 7. a	Cuantificación absoluta: sin marcaje.....	206
I. 7. b	Cuantificación relativa: con marcaje isotópico.....	207
I. 7. b. i	Marcaje químico.....	208

I. 7. b. ii	Marcaje metabólico.....	209
I. 8	Metabolómica.....	211
<i>ANEXO II: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....</i>		215
II. 1	Artículos científicos derivados directamente de la Tesis Doctoral.....	217
II. 2	Otros artículos científicos.....	218
II. 3	Capítulos de libro.....	219
II. 4	Comunicaciones a congresos.....	220

LISTA DE ABREVIATURAS

Aa	Aminoácido
AB.9	Células de fibroblasto de cola de pez cebra
Abs	Absorbancia
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AEMA	Agencia Europea de Medioambiente
AF	Ácido fórmico
ANOVA	Análisis estadístico de la varianza de un factor
APEX	Expresión de proteína absoluta
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovina
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CCD	Dispositivo de carga acoplada
CE	Energía de colisión
CID	Disociación inducida por colisión
CK	Creatina kinasa
DAPI	4'6'-diamidino-2-fenilindol
DIGE	Differential in-gel electrophoresis
DL	Línea de desolvatación
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDS	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EMA	Agencia de Medicina Europea
emPAI	Índice de abundancia de proteína modificada exponencialmente
EPA	Agencia de Protección Ambiental
ESI	Ionización por electrospray
ESSI	Ionización por pulverización electrosónica
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FBS	Suero fetal bovino
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSH	Hormona estimulante del folículo

FT-ICR	Analizador de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier
GC	Cromatografía de gases
GO	Gene Ontology
GSH	Glutación
GTP	Guanosín trifosfato
HaCaT	Queratinocitos humanos
Hek293	Células embrionarias de riñón humano
HeLa	Células de carcinoma de cuello uterino humano
HepG2	Células de hepatocarcinoma humano
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-metanosulfónico
hnRNP	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas
HPf	Horas post fertilización
Hos	Células de osteosarcoma humano
IAEA	Agencia Internacional de Energía Atómica
ID ₅₀	Concentración de la sustancia tóxica a la cual el 50% de las células no se multiplica
IT	Trampa iónica
ITRAQ	Marcaje isobárico para la cuantificación relativa y absoluta
LC	Cromatografía de líquidos
LC ₅₀	Concentración letal media
IsOH	Isopropanol
LED	Diodo emisor de luz
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
Lys	Lisina
MALDI	Ionización y desorción mediante láser asistida por matriz
MCP	Detector de placas de microcanales
MeHg	Metilmercurio
MeOH	Metanol
MRM	Monitoreo de reacción múltiple
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
m/z	Relación masa-carga
Neuro-2a	Células de neuroblastoma de ratón
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido

nanoESI	Nanoelectrospray
NCAs	Normas de calidad medioambiental
NCBI _{nr}	National Center for Biotechnology Information
NTERA2	Células germinales de carcinoma embrionario testicular humano
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
NP	Nanopartícula
NSAF	Factor de abundancia espectral normalizado
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI	Índice de abundancia de proteína
PBS	Disolución reguladora fosfato salina
PCA	Análisis de componentes principales
PCs	Componentes principales
PET	Tomografía por emisión de positrones
PI	Yoduro de propidio
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas de Medioambiente
PS	Fosfatidilserina
PTFE	Politetrafluoroetileno
Q	Cuadrupolo
QDs	Puntos cuánticos
QQQ	Triple cuadrupolo
Q-TOF	Combinación de cuadrupolo y tiempo de vuelo
Raw	Macrófagos de ratón
R _M	Cociente del área normalizada de metabolitos
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
R _{pt}	Repetibilidad
RSD	Desviación estándar relativa
R _{SILAC}	Cociente SILAC
R _{super-SILAC}	Cociente super-SILAC
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SILAC	Stable Isotopic Labeling by Amino Acids in Cell Culture
SIN	Índice espectral normalizado
S/N	Relación señal-ruido
TCA	Ácido tricloroacético
TDP-43	Proteína de unión a ADN TAR de 43 kDa
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TMCS	Cloruro de trimetilsililo

LISTA DE ABREVIATURAS

TMDD	2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol
TMS	Trimetilsililo
TOF	Tiempo de vuelo
TTC	Umbral de alarma toxicológica
UDP	Uridina difosfato
UPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución
US	Ultrasonidos
VDAC	Canal aniónico dependiente del voltaje mitocondrial
ZF4	Células de fibroblasto de embrión de pez cebra
β -ME	2-mercaptoetanol

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Resumen de algunos estudios in vitro e in vivo realizados para evaluar la toxicidad de diferentes tipos de QDs.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 2. Estudios representativos sobre la toxicidad del MeHg en modelos in vitro e in vivo.</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 3. Gradiente empleado para la separación de ATP, ADP, NADH y NAD⁺ mediante LC.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 4. Proteínas expresadas diferencialmente en células HepG2 expuestas a 50 mg/L de QDs de CdSe/ZnS durante 72 h.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 5. Proteínas expresadas diferencialmente en larvas de pez cebra expuestas a 2 mg/L de QDs de CdSe/ZnS durante 72h.....</i>	<i>80</i>
<i>Tabla 6. Optimización del método de extracción de metabolitos de un cultivo celular.....</i>	<i>96</i>
<i>Tabla 7. Metabolitos cuya concentración se ve aumentada significativamente en células Neuro-2a tras su exposición a MeHg (10 µM).</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 8. Metabolitos cuya concentración se ve disminuida significativamente en células Neuro-2a tras su exposición a MeHg (10 µM).</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 9. Metabolitos cuya concentración se ve aumentada significativamente en células Neuro-2a tras su exposición a MeHg (10 µM) y Se(IV) (10 µM).....</i>	<i>100</i>
<i>Tabla 10. Metabolitos cuya concentración se ve disminuida significativamente en células Neuro-2a tras su exposición a MeHg (10 µM) y Se(IV) (10 µM).....</i>	<i>101</i>
<i>Tabla 11. Transiciones MRM empleadas para la determinación de ATP, ADP, NADH y NAD⁺.....</i>	<i>107</i>
<i>Tabla 12. Parámetros analíticos que resumen la precisión y exactitud del método de análisis, así como el tiempo de retención y el efecto memoria (carry over) de cada compuesto. Rpt, corresponde con los resultados de repetibilidad.</i>	<i>110</i>
<i>Tabla 13. Proteínas inhibidas en células NTERA2 expuestas a 20 mg/L de Surfynol durante 72h.</i>	<i>126</i>
<i>Tabla 14. Proteínas sobreexpresadas en células NTERA2 expuestas a 20 mg/L de Surfynol durante 72h.</i>	<i>129</i>

<i>Tabla 15. Metabolitos cuya concentración se ve aumentada significativamente en células NTERA2 por efecto del Surfyrol (20 mg/L).....</i>	<i>133</i>
---	------------

<i>Tabla 16. Metabolitos cuya concentración se ve disminuida significativamente en células NTERA2 por efecto del Surfyrol (20 mg/L).....</i>	<i>134</i>
--	------------

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Esquema representativo del proceso de biomagnificación.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2. Representación de un QD con núcleo y recubrimiento binarios, y de la misma nanopartícula funcionalizada.</i>	<i>14</i>
<i>Figura 3. Imágenes obtenidas mediante PET de un tumor en un modelo in vivo de ratón a las 1, 17, 24 y 42 h tras la inyección intravenosa de QDs de CdSe/ZnS dopadas con ⁶⁴Cu. La flecha blanca señala la zona tumoral y la negra el hígado.</i>	<i>15</i>
<i>Figura 4. Reacción entre el MeHg y la cisteína que facilita la permeabilidad del MeHg a través de barreras biológicas. El complejo MeHg-cisteína posee una estructura similar a la metionina.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 5. Estructura molecular del tensioactivo Surfynol.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 6. Esquema de las diferentes etapas del procedimiento empleado en los experimentos SILAC.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 7. Esquema de las diferentes etapas del procedimiento seguido en la estrategia super-SILAC, empleando como sistema in vivo larvas de pez cebra.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 8. Esquema del procedimiento general de la estrategia de metabolómica no dirigida para la determinación de metabolitos mediante GC-TOF.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 9. Esquema del procedimiento general de la estrategia de metabolómica dirigida para la determinación de ATP, ADP, NADH, NAD⁺ mediante LC-ESI-QQQ.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 10. Viabilidad celular para diferentes líneas celulares expuestas a diferentes concentraciones de QDs de CdSe/ZnS durante 72 h. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT (n = 5).</i>	<i>64</i>
<i>Figura 11. Viabilidad de células HepG2 expuestas a 50 mg/L de QDs de CdSe/ZnS y concentraciones equimolares de los iones que componen su núcleo (Cd²⁺ y Se²⁻). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT (n = 5).</i>	<i>65</i>
<i>Figura 12. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HepG2 expuestas a 50 mg/L de QDs de CdSe/ZnS durante 0, 1, 12, 24, 48 y 72 h. Se muestra la superposición de tres imágenes correspondientes a los 3 canales adquiridos a diferentes longitudes de onda de emisión: faloidina como marcaje del citoesqueleto (verde), DAPI como marcaje nuclear (azul) y QDs (rojo).</i>	<i>66</i>
<i>Figura 13. Localización intracelular de los QDs en células HepG2 tras 72 h de exposición evaluada mediante TEM y EDS. A, micrografías de vacuolas de células expuestas a QDs (A1 y A2) y de células control (A3); B, espectros de EDS realizados sobre vacuolas de células expuestas a QDs (B1) y células</i>	

control (B2); C, micrografías de mitocondrias de células expuestas a QDs (C1 y C2) y de células control (C3); D, espectros de EDS realizados sobre mitocondrias de células expuestas a QDs (D1) y células control (D2). 68

Figura 14. Histogramas, representación bidimensional y tablas de porcentajes de las diferentes poblaciones celulares para cada una de las condiciones evaluadas: A, control; B, 10 mg/L de QDs; C, 50 mg/L de QDs; D, 100 mg/L de QDs. En todos los casos se emplearon células HepG2 y el tiempo de exposición a los QDs fue de 72 h. 70

Figura 15. Porcentaje de población celular en cada una de las fases del ciclo celular para cada una de las concentraciones de exposición a QDs evaluadas. Ninguna de las condiciones fue significativamente diferente a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$) ($n = 5$). 71

Figura 16. Distribución de los cocientes SILAC (R_{SILAC}) para las proteínas identificadas. 72

Figura 17. Principales procesos biológicos en los que están implicados las proteínas alteradas por efecto de los QDs en células HepG2. La información se ha obtenido de la base de datos GO. 75

Figura 18. Esquema general de las diferentes etapas optimizadas y las condiciones evaluadas y seleccionadas como óptimas (en verde claro) para la extracción de proteínas de larvas de pez cebra. 77

Figura 19. Imágenes de los geles SDS-PAGE donde se observa de forma cualitativa las proteínas extraídas de larvas de pez cebra empleando las diferentes condiciones evaluadas en las diferentes etapas: A, mecanismo de disrupción; B, composición del buffer de lisis; C, método de precipitación de proteínas. Todos los geles se tiñeron con azul de Coomassie. 79

Figura 20. Principales procesos biológicos en los que están implicados las proteínas alteradas por efecto de los QDs en larvas de pez cebra. La información se ha obtenido de la base de datos GO. 82

Figura 21. Resumen del mecanismo molecular asociado con la toxicidad de los QDs de CdSe/ZnS. Comparación de los resultados obtenidos en el modelo in vitro (A) vs el modelo in vivo (B). 89

Figura 22. Esquema general de las diferentes etapas optimizadas y las condiciones evaluadas y seleccionadas como óptimas (en verde claro) para la extracción de metabolitos de un cultivo celular. 94

Figura 23. (A) Cromatograma total de los metabolitos obtenidos mediante metabolómica no dirigida de las células Neuro-2a. (B) Espectro de MS de impacto electrónico del ácido 4-fenilbutírico utilizado como patrón interno y de la búsqueda que confirma su correcta identificación. 97

Figura 24. Red metabólica de conectividad de los metabolitos alterados estadísticamente tras la exposición al MeHg (valores de $p < 0,05$ con un nivel de confianza del 95%). 99

Figura 25. Red metabólica de conectividad de los metabolitos alterados estadísticamente tras la exposición a MeHg y Se(IV) (valores de $p < 0,05$ con un nivel de confianza del 95%).	102
Figura 26. Representación del análisis multivariante de PCA para los metabolitos encontrados en células Neuro-2a control y expuestas a MeHg y a MeHg-Se(IV) ($n = 10$).	103
Figura 27. Esquema general de las diferentes etapas optimizadas y las condiciones evaluadas y seleccionadas como óptimas (en verde claro) para la cuantificación de ATP, ADP, NADH y NAD ⁺ extraídos de un cultivo celular.	105
Figura 28. Espectros de MS/MS obtenidos a diferentes energías de colisión para la optimización de cada uno de los metabolitos. A, espectro de MS/MS del ATP, CE = 20 V. B, espectro de MS/MS del ADP, CE = 25 V. C, espectro de MS/MS del NADH, CE = 40 V. D, espectro de MS/MS del NAD ⁺ , CE = 25 V. Las flechas señalan los fragmentos seleccionados para cada metabolito.	106
Figura 29. Cromatograma típico obtenido empleando las condiciones óptimas para la separación cromatográfica de ATP, ADP, NADH y NAD ⁺ .	108
Figura 30. Niveles de los cuatro metabolitos cuantificados mediante metabolómica dirigida. Los datos se evaluaron mediante ANOVA y posterior test de Bonferroni. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; ns, no significativo ($n = 5$).	112
Figura 31. Principales rutas metabólicas asociadas con el mecanismo de toxicidad del MeHg deducido mediante técnicas de metabolómica no dirigida (azul) y dirigida (verde).	120
Figura 32. Análisis mediante UPLC-MS-Q-TOF que demuestra la migración del Surfynol a través del envase: A, cromatograma del Surfynol, B, blanco de migración con ácido acético al 3% como simulante alimentario. C, cromatograma del mismo simulante alimentario, pero con un envase multicapa que contiene Surfynol.	124
Figura 33. Representación de la disminución de la viabilidad de las células germinales NTERA2 con el aumento de la concentración de Surfynol ($n = 5$).	125
Figura 34. Principales procesos biológicos en los que están implicados las proteínas alteradas por efecto del Surfynol en células NTERA2. La información se ha obtenido de la base de datos GO.	131
Figura 35. Cromatograma total de los metabolitos obtenidos mediante metabolómica no dirigida de las células NTERA2.	132
Figura 36. Red metabólica de conectividad de los metabolitos alterados tras la exposición a Surfynol (valores de $p < 0,05$ con un nivel de confianza del 95%).	134

<i>Figura 37. Representación del análisis multivariante de PCA para los metabolitos encontrados en células NTERA2 control y expuestas a 20 mg/L de Surfynol (n = 7).</i>	135
<i>Figura 38. Niveles de los cuatro metabolitos cuantificados mediante metabolómica dirigida. Los datos se evaluaron mediante ANOVA y posterior test de Bonferroni. ***p < 0,001; ns, no significativo (n = 7).</i>	136
<i>Figura 39. Representación de la disminución de la viabilidad de dos líneas celulares somáticas a medida que aumenta la concentración de Surfynol (n = 5).</i>	137
<i>Figura 40. Porcentaje de población celular sanas, apoptóticas y necróticas tras su exposición a 20 mg/L de Surfynol. A, células HeLa; B, células HepG2. Los datos se evaluaron mediante el test de la t de Student a un nivel de confianza del 95%, *p < 0,05; ns, no significativo (n = 3).</i>	138
<i>Figura 41. Principales rutas metabólicas asociadas con el mecanismo de toxicidad del Surfynol, deducido mediante técnicas de proteómica (rojo), metabolómica no dirigida (azul) y metabolómica dirigida (verde).</i>	147
<i>Figura 42. Reducción de MTT a formazán.</i>	188
<i>Figura 43. Espectro de absorción y de emisión de un fluorocromo.</i>	189
<i>Figura 44. Fases que componen el ciclo de división celular: Interfase (G1, S, G2) y mitosis (M).</i>	192
<i>Figura 45. Representación del uso de anexina V-FITC y yoduro de propidio para identificar células sanas, apoptóticas o necróticas en función de la estructura de la membrana.</i>	193
<i>Figura 46. Esquema de los elementos básicos que conforman un espectrómetro de masas.</i>	196
<i>Figura 47. Fuentes de ionización suave A: MALDI y B: ESI.</i>	199
<i>Figura 48. Analizadores de masas más comunes. A: TOF, B: Q, C: IT, D: FT-ICR.</i>	203
<i>Figura 49. Esquema de un analizador de triple cuadrupolo, mostrando el modo de trabajo MRM.</i>	204
<i>Figura 50. Representación del procedimiento de las estrategias de análisis de proteómica cuantitativa absoluta y relativa; así como la comparación de las dos técnicas de cuantificación relativa más relevantes: SILAC (marcaje metabólico) y iTRAQ (marcaje químico).</i>	206
<i>Figura 51. Reacciones de derivatización realizadas para volatilizar compuestos por orden de utilización.</i>	213

RESUMEN/SUMMARY

**NUEVAS APROXIMACIONES BASADAS EN TÉCNICAS ÓMICAS PARA LA
EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE TOXICIDAD DE CONTAMINANTES
ALIMENTARIOS Y AMBIENTALES**

La relevancia de los estudios toxicológicos recae en la preocupación por garantizar la seguridad del ser humano, de otras especies y del medioambiente. Tanto es así que existen diversos organismos públicos que se encargan de controlar y legislar la presencia de diferentes compuestos tóxicos en alimentos, fármacos, cosméticos, muestras medioambientales, etc. Dado que la toxicidad de un determinado compuesto siempre depende de la concentración a la que se encuentre, es necesario establecer unos límites máximos permitidos a partir de resultados obtenidos en diferentes tipos de estudios: caracterización fisicoquímica, evaluación de presencia y persistencia en el medioambiente, capacidad de bioacumulación, biomagnificación, transformación en el interior de organismos vivos, etc. Este conjunto de resultados permite la clasificación de los compuestos en función de su toxicidad. Sin embargo, un aspecto adicional que ha ido adquiriendo cada vez más importancia en los últimos años, es poder llegar a entender y elucidar cuáles son los mecanismos biomoleculares implicados y relacionados con la toxicidad de un determinado compuesto tras su interacción con un organismo dado. Es aquí donde las disciplinas ómicas juegan un papel destacable y fundamental, ya que, al tratarse de herramientas de descubrimiento, permiten identificar biomoléculas de forma masiva y no dirigida, ayudando así a elucidar dichos

mecanismos de toxicidad o detoxificación a nivel molecular. Además, el conocimiento de estos mecanismos, no sólo constituye una herramienta de gran utilidad para clasificar de forma más exhaustiva a los compuestos en función de su toxicidad, sino que también ofrece la posibilidad de encontrar potenciales dianas terapéuticas que permitan, en algunos casos, revertir el daño generado tras la exposición a un determinado compuesto tóxico.

Dentro de las ciencias ómicas, tanto la proteómica como la metabolómica han experimentado un enorme auge en las últimas décadas debido, principalmente, al importante desarrollo instrumental de la técnica de espectrometría de masas. Estas nuevas ciencias, las cuales han sido aplicadas tradicional y fundamentalmente al ámbito biomédico, permiten la identificación y cuantificación de un número muy elevado de analitos (proteínas y metabolitos) en muestras biológicas complejas.

Por todo ello, en la presente Tesis Doctoral se aborda la aplicación de herramientas de proteómica y metabolómica, así como de otras estrategias bioanalíticas, para evaluar la toxicidad y elucidar los mecanismos biomoleculares asociados a tres compuestos potencialmente tóxicos de diferente naturaleza química y que se encuentran presentes en el medioambiente y en alimentos. En concreto, se ha seleccionado un nanomaterial (puntos cuánticos o quantum dots de CdSe/ZnS), un metal pesado (mercurio en su forma metilada, MeHg) y un surfactante orgánico (2,4,7,9-tetrametil-5-decino-4,7-diol conocido como Surfynol).

En el primer capítulo se ha evaluado la potencial toxicidad de los puntos cuánticos de CdSe/ZnS (QDs), por tratarse de un producto muy extendido que principalmente ha revolucionado la tecnología de los dispositivos optoelectrónicos y el diagnóstico médico por bioimagen. Para ello, se han llevado a cabo ensayos de viabilidad, internalización y localización intracelular. Asimismo, se han implementado satisfactoriamente las estrategias de proteómica cuantitativa SILAC y super-SILAC en modelos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, permitiendo así elucidar el mecanismo de toxicidad de estas nanopartículas relacionado con la generación de ROS y la inducción de apoptosis celular mediante la formación de agregados de TDP-43. También se han podido discernir las bases moleculares origen de los daños estructurales observados

en el desarrollo de un organismo, en concreto de larvas de pez cebra, expuesto a este nanomaterial.

En el segundo capítulo se ha estudiado el MeHg, cuya presencia en el medioambiente ocurre de manera natural a partir de la biotransformación del Hg. Sin embargo, mediante un proceso conocido como biomagnificación, su presencia en el medio acuático y, concretamente, en peces de gran tamaño, alcanza una concentración que puede ser perjudicial para la salud. Se han realizado numerosos estudios que ponen de manifiesto que el MeHg es uno de los compuestos conocidos con mayor toxicidad, afectando especialmente al sistema neurológico. En esta Tesis Doctoral se ha empleado la metabolómica, tanto la estrategia no dirigida como la dirigida, para profundizar en las rutas metabólicas afectadas por la exposición al MeHg. Este trabajo ha permitido completar trabajos previos basados en estrategias genómicas y proteómicas. De esta forma se ha confirmado el desequilibrio energético inducido por el MeHg y se ha demostrado la activación del ciclo de Krebs y el ciclo de la urea como mecanismos de detoxificación en células expuestas a MeHg. Por otro lado, también se ha evaluado el papel del Se(IV) como agente protector sobre los efectos nocivos del MeHg.

Finalmente, en el tercer capítulo se aborda el estudio del potencial tóxico del Surfynol, un tensioactivo con numerosas aplicaciones en la industria entre las que destaca su uso como adhesivo en el empaquetado alimentario. La posible toxicidad de este compuesto no se había estudiado previamente, a pesar de tener capacidad de migración desde el envase hasta el alimento y, por tanto, suponer un riesgo potencial para la salud. Los estudios llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral han demostrado que efectivamente este compuesto afecta a la capacidad reproductora y, en concreto, al metabolismo energético y a la motilidad de los espermatozoides. Además, mediante la combinación de estrategias de proteómica y metabolómica se han identificado tanto mecanismos moleculares como diferentes rutas metabólicas alteradas, que demuestran y explican la toxicidad asociada al Surfynol en células germinales predecesoras de espermatozoides maduros.

En conclusión, en la presente Tesis Doctoral se han empleado estrategias de proteómica y metabolómica, en combinación con otro tipo de herramientas

bioanalíticas, para profundizar en los mecanismos biomoleculares de acción de tres compuestos tóxicos de diferente naturaleza química, demostrando así la necesidad y la relevancia de estas técnicas para complementar los estudios toxicológicos que, generalmente, se llevan a cabo con objeto de preservar el medioambiente y de controlar la seguridad alimentaria.

NEW APPROACHES BASED ON OMIC TECHNIQUES FOR THE EVALUATION OF THE TOXICITY MECHANISMS OF FOOD AND ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS

The relevance of toxicological studies lies in the concern to ensure the safety of humans, other species and the environment. So much so that there are various public organisms that are responsible for controlling and legislating the presence of different toxic compounds in food, pharmaceuticals, cosmetics, environmental samples, and so on. Given that the toxicity of a given compound always depends on the concentration at which it is found; it is necessary to establish maximum permitted limits based on results obtained in different types of studies: physicochemical characterization, evaluation of presence and persistence in the environment, bioaccumulation capacity, biomagnification or transformation within living organisms, etc. This set of results allows the classification of compounds according to their toxicity. However, an additional aspect that has become increasingly important in recent years is the ability to understand and elucidate the biomolecular mechanisms involved in the toxicity of a given compound after its interaction with a given organism. It is here where the omics disciplines play an outstanding and fundamental role, since, being tools for discovery, they allow to identify biomolecules in a massive and non-targeted way, thus helping to elucidate these mechanisms of toxicity or detoxification at the molecular level. In addition, knowledge of these mechanisms not only constitutes a very useful tool for

classifying compounds more exhaustively according to their toxicity, but also offers the possibility of finding potential therapeutic targets that allow, in some cases, to reverse the damage generated after exposure to a given toxic compound.

Within the omics disciplines, both proteomics and metabolomics have experienced an enormous boost in recent decades, mainly due to the important instrumental development of the mass spectrometry technique. These new technologies have been applied traditionally and fundamentally to the biomedical field and allow the identification and quantification of a very high number of analytes (proteins and metabolites) in complex biological samples.

For all these reasons, this Doctoral Thesis deals with the application of proteomics and metabolomics tools, as well as other bioanalytic strategies, to evaluate the toxicity and elucidate the biomolecular mechanisms associated with three potentially toxic compounds of different chemical nature, that are present in the environment and in food. In particular, a nanomaterial (CdSe/ZnS quantum dots), a heavy metal (mercury in its methylated form, MeHg) and an organic surfactant (2,4,7,9-tetramethyl-5-decino-4,7-diol known as Surfynol) have been selected.

In the first chapter of the present Doctoral Thesis, the potential toxicity of CdSe/ZnS quantum dots (QDs) has been evaluated, as it is a very widespread product that has mainly revolutionized the technology of optoelectronic devices and medical diagnosis by bioimaging. To this end, internalization and intracellular localization tests have been carried out. Likewise, SILAC and super-SILAC quantitative proteomics strategies have been successfully implemented in *in vitro* and *in vivo* models, respectively; thus allowing elucidating the toxicity mechanisms of these nanoparticles related to the generation of ROS and the induction of cellular apoptosis through the formation of TDP-43 aggregates. It has also been possible to discern the molecular bases origin of the structural damage observed in the development of an organism, specifically zebrafish larvae, exposed to this nanomaterial.

In the second chapter MeHg has been studied, whose presence in the environment occurs naturally from the biotransformation of Hg. However, through a process known as biomagnification, its presence in the aquatic environment, and specifically in large

fish, reaches a concentration that can be harmful to health. Numerous studies have been carried out and show that MeHg is one of the most toxic compounds known, especially affecting the neurological system. In this Doctoral Thesis, metabolomics, both non-targeted and targeted strategies, have been used to delve deeper into the metabolic pathways affected by MeHg exposure. This work has allowed us to complete previous work based on genomic and proteomic strategies. In this way, the energy imbalance induced by MeHg has been confirmed and the activation of the Krebs cycle and the urea cycle as detoxification mechanisms in cells exposed to MeHg has been demonstrated. On the other hand, the role of Se(IV) as a protective agent has also been evaluated.

Finally, the third chapter of this Doctoral Thesis deals with the study of the potential toxicity of Surfynol, a surfactant with numerous applications in industry, highlighting its use in food packaging. The potential toxicity of this compound had not been previously studied, despite its ability to migrate from the packaging to the food, and therefore the potential risk to health. The studies carried out in this Doctoral Thesis have shown that this compound effectively affects reproductive capacity, and in particular energy metabolism and sperm motility. In addition, by combining proteomics and metabolomics strategies, both molecular mechanisms and different altered metabolic pathways have been identified, which demonstrate and explain the toxicity associated with Surfynol in germinal cells predecessor to mature spermatozoa.

In conclusion, in this Doctoral Thesis, proteomics and metabolomics strategies have been used, in combination with other types of bioanalytic tools, to gain a deeper insight into the biomolecular mechanisms of three toxic compounds of different chemical nature; thus, demonstrating the need and relevance of these techniques to complement the toxicological studies, which are generally carried out with the aim of preserving the environment and controlling food safety.

INTRODUCCIÓN

La toxicología es una ciencia multidisciplinar que evalúa los efectos adversos de los compuestos químicos sobre los organismos vivos y el medioambiente. La palabra toxicología deriva del griego *toxicon*, que significa veneno, y *logos*, que significa estudio. Quizás la mejor definición para la palabra tóxico la realizó Paracelsus en el siglo XVI, cuando al evaluar la toxicidad de diferentes sales metálicas en la búsqueda de tratamientos para diversas enfermedades, concluyó que: "...todas las sustancias son tóxicas y sólo la dosis determina su efecto". El envenenamiento, ya sea intencionado o accidental, ha tenido un papel importante en numerosos eventos de nuestra historia. Hay evidencias de que egipcios, griegos y romanos ya eran conscientes del efecto tóxico de compuestos como la cicuta, el plomo o el antimonio, e incluso crearon antídotos para posibles intoxicaciones. En el siglo XVII el conocimiento de la toxicidad de diversos compuestos supuso una gran amenaza para Europa occidental. Como hecho histórico relevante de esta época destaca el caso de Heironyma Spara que comercializó un cosmético compuesto por fósforo blanco con el único objetivo de que las mujeres descontentas con sus maridos enviudaran pronto. Cuando este hecho llegó a las autoridades ya era demasiado tarde, habían muerto más de 600 personas y, como castigo, esta mujer y otras doce más fueron ahorcadas [1–3].

Fue en 1814 cuando se reconoció al español Mateo J. B. Orfilia como el fundador de la toxicología como ciencia tras publicar su trabajo denominado "*Triate de toxicologie*" en el que dividía los compuestos tóxicos en seis clases: corrosivos, astringentes, ácidos, narcóticos, acres y sépticos. Orfilia fue el primero en utilizar métodos cualitativos para evaluar la toxicidad de diferentes compuestos en animales. Durante el siglo XIX se dieron numerosos casos de muerte por envenenamiento con arsénico y, como consecuencia, se empezaron a desarrollar instrumentos capaces de medir los niveles de este elemento. El avance de la farmacología fue una de las principales razones de la expansión de la toxicología a nivel mundial. En 1906 se creó la Administración de Alimentos y Fármacos, con sus siglas en inglés FDA, en Estados Unidos. La regularización legal de compuestos tóxicos comenzó a principios del siglo XX con el avance de las técnicas de análisis, fue entre los años 1930s y 1960s cuando se desarrollaron métodos colorimétricos, la espectrofotometría ultravioleta e infrarroja y, finalmente, la cromatografía de gases. En esta época la comercialización del fármaco bactericida denominado "Elixir de la sulfanilamida", generó otra alerta de salud pública al provocar la muerte de 73 personas. La consciencia de este hecho se reflejó por primera vez en el año 1937 mediante una ley que prohibió la venta de alimentos o fármacos sin etiquetar, además se exigió que todos los fármacos fueran testados previamente en animales. En 1938 la FDA prohibió la utilización de adulterantes en alimentos y fármacos, y poco a poco fue incorporando tolerancias para diversos compuestos como los pesticidas en productos agrícolas, aditivos o compuestos tóxicos que pudieran migrar del empaquetado al alimento. Además, desarrolló y unificó protocolos para testar la toxicidad de alimentos y fármacos. Por otro lado, desde 1970 la toxicología medioambiental está principalmente controlada por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, según sus siglas en inglés) de Estados Unidos, regulando desde la fecha la calidad del agua, del aire, desechos tóxicos y pesticidas para garantizar la protección de la salud humana [2,3]. La Agencia Europea de Medio-ambiente (AEMA), de la que España es miembro, cumple esta misma misión en el espacio europeo desde 1990. De la misma forma, existen desde 1995 la Agencia de Medicina Europea (EMA), y desde 2002 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), que poseen la responsabilidad de proporcionar los métodos científicos para alertar y

detectar todos aquellos problemas que afecten a la seguridad de medicinas y alimentos en Europa.

1. Estudios de toxicidad convencionales

Tal y como se ha comentado anteriormente, los estudios toxicológicos experimentales han adquirido cada vez más importancia, lo que ha llevado al desarrollo progresivo de estrategias para la evaluación de la toxicidad de compuestos presentes en el medioambiente, en alimentos, y en todo tipo de productos en contacto con organismos vivos. En 1981, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) publicó una guía en la que se describen los métodos a seguir para evaluar la toxicidad de un determinado compuesto [4], la cual consta principalmente de cuatro apartados: análisis de las características fisicoquímicas, persistencia y concentración a la que se encuentran en el medioambiente, efectos en sistemas vivos y efectos para la salud [5,6].

La evaluación de las características fisicoquímicas es el primer paso de muchos estudios de toxicidad. En esta primera etapa desempeñan un papel muy importante las técnicas analíticas de imagen como la microscopía de fuerza atómica y la microscopía electrónica de barrido y de transmisión, así como otras técnicas espectroscópicas y no espectroscópicas de caracterización analítica. En estos estudios se determina generalmente el tamaño, forma, composición, peso molecular, pureza, solubilidad, estado de agregación, propiedades superficiales y estabilidad del compuesto objeto de estudio, lo que da una primera idea de la potencial toxicidad del mismo [7-9].

La evaluación de la persistencia en el medioambiente de los compuestos potencialmente tóxicos, se basa en cuantificar la concentración del compuesto tóxico en diferentes localizaciones geográficas, a diferentes horas e incluso en diferentes épocas del año, para asegurar así el análisis en todas las condiciones climatológicas posibles. Estos compuestos pueden provenir de la naturaleza, aunque generalmente aparecen como resultado de la actividad antropogénica a través de la agricultura o de residuos industriales. Existen numerosas publicaciones enfocadas a este tipo de

análisis en las que se determinan la presencia de compuestos orgánicos como fenoles [10], tensioactivos [11], metales [12,13] e incluso nanopartículas [14].

Las posibles vías de entrada de los compuestos tóxicos en los organismos vivos son la inhalación, absorción a través de la piel o directamente la ingesta o inyección intravenosa. Además, los compuestos tóxicos pueden distribuirse fácilmente por el organismo y acumularse en diferentes órganos. Por ello, parte de los estudios de toxicidad convencionales se centran en evaluar el nivel de concentración y el tiempo de exposición a los cuales el compuesto en cuestión resulta tóxico. En estos trabajos se calcula la concentración a la cual muere el 50% de la población (LC₅₀) así como los factores de bioacumulación o biomagnificación [15]. Estos estudios de biomagnificación resultan de gran interés, ya que un compuesto que aparentemente se encuentre en el medioambiente en cantidades inocuas para los seres vivos, puede incrementar su concentración al ir subiendo de nivel en la cadena trófica hasta llegar a ser tóxico para los humanos, situados al final de la misma [16] (**Figura 1**). Hay estudios en los que se llega a profundizar más, estudiándose los posibles efectos sinérgicos o antagónicos que se producen al interaccionar dos o más compuestos potencialmente tóxicos [17,18], o el órgano u órganos en los que se produce el efecto de bioacumulación y/o daño para un determinado organismo expuesto a un potencial compuesto tóxico [19]. De la misma manera, existen estudios que se centran en la cinética de degradación, eliminación o transformación de un determinado compuesto [19–21]. Todos estos trabajos toxicológicos se basan en estudios que utilizan diferentes modelos *in vitro*, principalmente líneas celulares, y modelos *in vivo*, entre los que se encuentran: peces, larvas, moscas, plantas e incluso primates.

Para la realización de estos estudios toxicológicos que podemos denominar convencionales y que vienen recogidos en la guía publicada por la OECD [4], se recurre generalmente y en primer lugar al desarrollo de procedimientos de tratamiento de muestra, implementando así métodos de extracción, aislamiento y preconcentración del compuesto de interés. Por otra parte, serán las técnicas analíticas instrumentales las que permitan la detección y cuantificación de los mismos, entre las que destacan las técnicas ópticas espectroscópicas y no espectroscópicas, las técnicas electroquímicas y la espectrometría de masas (MS). En muchos de los casos, estas técnicas se acoplan a

técnicas cromatográficas de líquidos (LC) o de gases (GC) que permiten el análisis de muestras complejas.

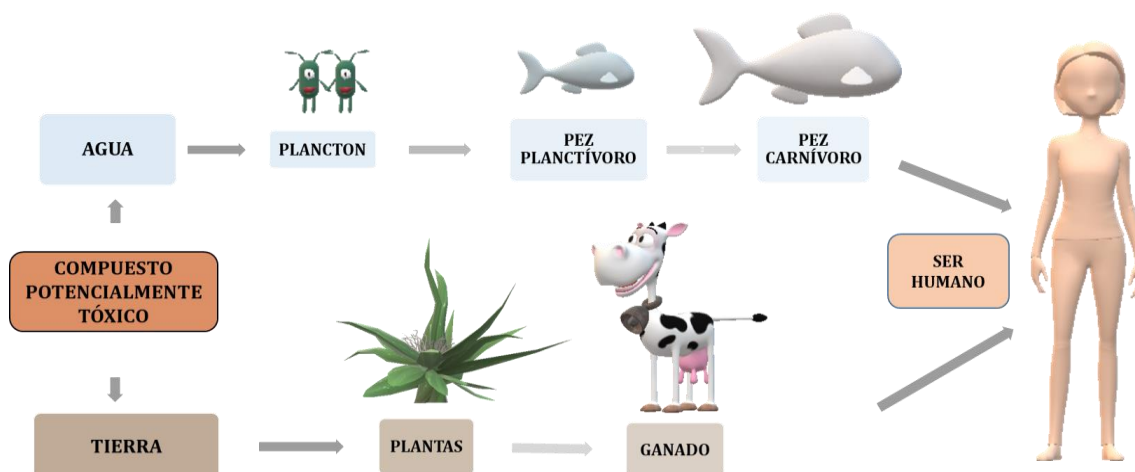


Figura 1. Esquema representativo del proceso de biomagnificación.

2. Relevancia de las técnicas ómicas en el análisis toxicológico

Las ciencias ómicas son ciencias relativamente jóvenes que permiten obtener una visión global de los diferentes grupos de biomoléculas que componen una célula, un tejido o un organismo. Están dirigidas a la identificación masiva de genes (genómica), mRNAs (transcriptómica), proteínas (proteómica) y metabolitos (metabolómica). La relevancia de su utilización es indiscutible hoy en día, y viene avalada por el enorme número de artículos científicos que las emplean, y la gran cantidad de revistas especializadas que han aparecido en las últimas décadas. Esto se debe, en gran medida, a que las técnicas ómicas tienen un papel fundamental en la elucidación de los mecanismos biomoleculares subyacentes a un determinado proceso o efecto, como puede ser el desarrollo o progreso de una determinada enfermedad, o los mecanismos asociados a la toxicidad ejercida por un determinado compuesto [23,24]. Además, la combinación de dos o más técnicas ómicas puede llegar a proporcionar un flujo de

información lo suficientemente grande como para permitir comprender, a nivel molecular, cómo afecta a un ser vivo la exposición a un determinado compuesto [25–28]. La representatividad en el tipo y número de muestras analizadas adquiere especial importancia en estos experimentos, ya que la elevada variabilidad biológica puede ser determinante en la validez de los resultados obtenidos.

Dentro de las ciencias ómicas, la primera disciplina en aparecer fue la genómica; sin embargo, la proteómica y la metabolómica, tal como las conocemos ahora, han ido adquiriendo cada vez más importancia, ya que contribuyen de forma más realista a proporcionar información acerca del mecanismo molecular inducido como consecuencia del efecto tóxico de un determinado compuesto. Este hecho se fundamenta en el dogma de la biología molecular según el cual un mismo gen puede codificar para varias proteínas. Durante la biosíntesis de proteínas, las diferentes modificaciones postraduccionales dan lugar a diferentes proteínas modificadas que permiten la amplia variedad de funciones que desempeñan. A su vez, la alteración de estas funciones causada por agentes tanto externos como internos, son las que desencadenan la alteración de diferentes rutas metabólicas, desarrollando así distintos tipos de respuesta o, en determinados casos, incluso enfermedades [29,30].

Tal y como se expondrá más adelante, uno de los principales objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido la evaluación de los mecanismos biomoleculares responsables de los efectos tóxicos inducidos por compuestos de diferente naturaleza, por tanto, y en base a lo comentado anteriormente, se han empleado fundamentalmente estrategias de proteómica y metabolómica.

El término proteómica apareció por primera vez en 1994 y se refiere al estudio de proteínas a gran escala, su estructura y su papel fisiológico o funciones que realizan en un organismo concreto. Las proteínas son componentes celulares por excelencia en cualquier organismo vivo [31]. El análisis del proteoma de una célula o tejido es mucho más complejo que el del genoma, ya que el proteoma está en constante cambio en función de las necesidades biológicas en respuesta a estímulos internos y externos y, mientras que una célula expresa alrededor de 10^4 genes, una muestra biológica puede alcanzar un total de 10^6 proteínas [32,33].

La aparición en la década de los 90s de la espectrometría de masas aplicada a muestras biológicas supuso un avance importante en la tarea de identificar y cuantificar proteínas. Generalmente, la espectrometría de masas se utiliza en combinación con técnicas de separación tales como la electroforesis en gel y la cromatografía líquida. Debido a que las proteínas son macromoléculas de gran tamaño, son normalmente digeridas para originar péptidos más fácilmente secuenciables, que son identificados cotejando los espectros de MS/MS obtenidos experimentalmente, con los espectros generados “in silico” por los motores de búsqueda que contienen las librerías de bases de datos [1,32]. En 1993 se publicó el primer método para correlacionar el mapa de masas peptídicas obtenido por espectrometría de masas con la secuencia de proteínas mediante el empleo de bases de datos [34–36]; y ya en 1996 se realizó por primera vez la identificación de proteínas de levadura a gran escala [37].

A pesar de que el campo principal de aplicación de la proteómica es el área biomédica, existen estudios donde se han empleado diferentes estrategias proteómicas para evaluar la potencial toxicidad de una amplia variedad de compuestos tales como tabaco [38], fármacos [39], metales [40], nanopartículas [41] y compuestos orgánicos [42], entre otros. Dentro de este campo, los métodos de cuantificación de proteínas son especialmente importantes, ya que permiten identificar proteínas diferencialmente expresadas entre dos o más muestras correspondientes a diferentes estados, permitiendo así identificar los mecanismos biomoleculares que se ven alterados tras la exposición a un determinado agente tóxico. Para ello, más que una cuantificación absoluta, se necesita una cuantificación relativa de las proteínas que permita clasificar el conjunto del proteoma en: proteínas sobreexpresadas, proteínas inhibidas o proteínas que no se alteran en un determinado sistema tras la exposición a un tóxico concreto en unas condiciones experimentales debidamente seleccionadas.

Existen diferentes estrategias de cuantificación de proteínas que se han aplicado al campo de la toxicología, y que van desde geles bidimensionales empleando tinción con plata [43] o marcaje DIGE (differential in-gel electrophoresis) [44] hasta estrategias más sofisticadas tales como SILAC (stable isotopic labeling by amino acids in cell culture) [45] y iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) [46]. Además, la evolución en el desarrollo de instrumentación de espectrometría de masas,

ha favorecido recientemente un aumento significativo de la reproducibilidad, la resolución y la exactitud alcanzada con estos equipos, de manera que hoy en día existen los denominados métodos “sin marcaje” que permiten la cuantificación relativa sin necesidad de marcaje [47].

El término metabolómica se utiliza para describir el estudio del universo de las pequeñas moléculas que sirven como sustratos, productos y cofactores de las miles de reacciones enzimáticas y de otros procesos metabólicos que suceden en las células vivas y, por ende, en cualquier organismo vivo. Al igual que el proteoma, el metaboloma se centra en el estudio de los cambios sistemáticos o temporales que se producen en los niveles de abundancia de los metabolitos en un sistema vivo como consecuencia de algún tipo de evento. Las primeras medidas de los niveles de pequeñas moléculas orgánicas, tales como el ácido láctico, cítrico u oxálico, fueron realizadas en 1777 por Lavoisier. Entre 1945 y 1957 se habían ya elucidado rutas biosintéticas para prácticamente toda clase de moléculas biológicas, incluyendo lípidos, carbohidratos, bases de ácidos nucleicos, aminoácidos y vitaminas. En 1955, Donald Nicholson compiló todas las reacciones metabólicas conocidas hasta ese momento en un solo mapa compuesto únicamente por unas 20 rutas metabólicas. Por tanto, la mayor parte de fórmulas moleculares y estructuras de metabolitos habían sido descubiertas incluso antes de que lo fuese la primera estructura de una proteína con resolución atómica, la elucidación de la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) en 1953, o la posterior publicación del dogma central de la biología molecular en 1958 [48,49].

El desarrollo de las técnicas de MS y de resonancia magnética nuclear (RMN) ha dado lugar a la metabolómica que conocemos hoy en día [1,48]; siendo ambas técnicas las más empleadas para el análisis simultáneo de multitud de metabolitos [50,51]. Mientras que la RMN es la herramienta predominante para la determinación del perfil metabólico ya que es rápida, robusta y requiere mínimo tratamiento de muestra, la MS presenta una mayor sensibilidad y selectividad, por lo que es capaz de detectar sustancias a concentraciones significativamente más bajas que la RMN, y en los últimos años se ha convertido en la técnica principal en la mayoría de los estudios, generalmente acoplada a cromatografía de gases o de líquidos [52].

Existen dos tipos de aproximaciones en metabolómica, la que se conoce como metabolómica no dirigida, en la que se identifican y/o cuantifican todos los metabolitos presentes en una muestra sin que haya ningún tipo de premisa en cuanto a la naturaleza de los metabolitos que se quieren determinar [53], y la metabolómica dirigida, que se centra en la determinación de un número reducido de metabolitos conocidos a priori y para los cuales se diseña el proceso analítico [54]. En el primer caso, es necesario emplear equipos de MS de alta resolución, ya que al tratarse de metabolitos desconocidos, es necesario obtener valores de masa exacta y patrones de fragmentación y envoltura isotópica que permitan identificar a los metabolitos de forma inequívoca, tarea que suele resultar especialmente complicada [55]. Además, hay que considerar la complejidad de este tipo de ensayos en tanto que las propiedades fisicoquímicas difieren mucho de unos metabolitos a otros. Existe una gran diversidad de estructuras moleculares que se refleja en una amplia gama de polaridades, pesos moleculares, grupos funcionales, estabilidad, solubilidad y reactividad química. En este sentido, el uso del acoplamiento GC-MS, a pesar de tratarse de una técnica que sólo puede ser empleada para determinar metabolitos volátiles (o que sean volátiles tras una derivatización previa) y termoestables, posee una ventaja excepcional. Dado que la fragmentación de las moléculas por impacto electrónico es muy reproducible, sí que existen librerías de compuestos con las que comparar los datos experimentales, permitiendo así una identificación rápida y exacta en la mayoría de los casos [52,56]. Por tanto, si bien es cierto que esta técnica no permite determinar la totalidad de los metabolitos en un único análisis, su combinación con diferentes procesos de derivatización consigue identificar metabolitos pertenecientes a diferentes clases: azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, esteroides y otras pequeñas moléculas [57].

Al igual que en el caso de la proteómica y la genómica, la metabolómica también ha sido aplicada principalmente al campo biomédico. No obstante, su relativamente reciente incursión en el campo de la toxicología también está permitiendo la obtención de perfiles metabólicos alterados por la exposición a diversos compuestos tóxicos [58–61], permitiendo así identificar y confirmar diferentes mecanismos y procesos bioquímicos asociados al efecto tóxico ejercido por dichos compuestos.

3. Nanopartículas: Quantum dots

En los últimos años el campo de la nanotecnología ha experimentado un auge extraordinario. Dentro de los diferentes nanomateriales que se han generado, las nanopartículas (NPs) se sitúan en primer lugar en cuanto a su campo de aplicación, habiéndose incorporado en numerosos productos de consumo. No sólo están siendo muy utilizadas para productos electrónicos y tecnológicos [62], sino que también se emplean en biomedicina [63] y como herramientas analíticas [64].

Las NPs se definen como nanomateriales con un diámetro entre 1 y 100 nm, lo que le otorga propiedades únicas, especialmente debido al gran área superficial que les confiere una mayor reactividad. El conjunto de propiedades fisicoquímicas de unas determinadas NPs (tamaño, composición, forma, estabilidad, recubrimiento, etc.) así como su funcionalización, pueden ser cruciales para determinar su potencial citotóxico y su capacidad de internalización celular y de distribución una vez dentro de un organismo [65].

Dentro de las diferentes NPs que se utilizan hoy en día, destaca el empleo de los puntos cuánticos o quantum dots (QDs), debido principalmente a su amplio rango de aplicaciones en la mejora de la calidad de dispositivos tecnológicos y médicos. Los QDs son partículas cristalinas y semiconductoras prácticamente esféricas que poseen un diámetro inferior a 10 nm y contienen entre 200 y 1000 átomos. El descubrimiento de estas NPs en los 80s se debe a Alexei Ekimov, aunque Louis Brus fue el primero en obtenerlos en disolución coloidal en esa misma época [66]. El término “quantum dot” se empleó por primera vez en 1988 por Mark A. Green, su significado proviene del término “quantum”, relacionado con el hecho de que su comportamiento y propiedades están principalmente gobernadas por las reglas de la mecánica cuántica, más que por la clásica, y “dot”, relacionado con las pequeñas dimensiones de estas nanopartículas [67,68]. En definitiva, las características físico-químicas que presentan estos nanomateriales se explican por el fuerte confinamiento de los electrones cuando el radio de la nanopartícula es de menor tamaño que su radio de excitación de Bohr ($\sim 1\text{-}50\text{ nm}$) [69].

En compuestos semiconductores como los QDs, la fluorescencia emitida es debida a la absorción de un fotón que origina el paso de un electrón desde la banda de valencia a la de conducción. Los electrones excitados en la banda de conducción dejan huecos en la banda de valencia, y la recombinación del electrón excitado con el hueco en la banda de valencia, va acompañada de la emisión de luz. El fenómeno de luminiscencia también puede deberse a la creación de excitones. Un excitón es un par electrón-hueco unido por fuerzas de Coulomb, con el electrón en la banda de conducción y el hueco en la banda de valencia. Como este excitón es un enlace, el cómputo de carga para esta quasi-partícula es cero, y por tanto no posee conductividad. Sin embargo, el excitón entero puede moverse a través del cristal molecular liberándose esta energía cinética adicional como radiación. La anchura de la banda de energía depende del tamaño de la partícula semiconductor; cuanto más grande es la NP, más pequeña será dicha banda y, por tanto, la emisión de luz resultante será de baja energía (color rojo). Por el contrario, NPs pequeñas emitirán radiación azulada de mayor energía. Los picos de emisión de los QDs pueden variar desde los 450 a los 1800 nm manipulando su tamaño, forma, composición y estructura [70]. Esto confiere a estas NPs propiedades electrónicas únicas, así como tener un espectro de emisión estrecho y una larga fotoestabilidad.

La mayoría de los QDs son cristales semiconductores binarios en los que el núcleo está compuesto por dos átomos de elementos de grupos diferentes de la tabla periódica. Siendo la combinación de elementos de los grupos II y VI la más utilizada: sulfuro de zinc (ZnS), seleniuro de zinc (ZnSe), seleniuro de cadmio (CdSe), telurio de cadmio (CdTe) y sulfuro de plomo (PbS). En estos nanocristales los átomos suelen alinearse periódicamente formando estructuras cristalinas tipo cúbica (zinc, blenda) o hexagonal (wurtzita). Los grupos III y V también se combinan para formar fosfato de indio (InPO_4), arseniato de indio (InAsO_4), arseniato de galio (GaAsO_4) y nitruro de galio (GaN). Además del núcleo de cristal binario, los QDs suelen incluir un recubrimiento que estabiliza y aumenta el rendimiento cuántico. Estos recubrimientos vuelven a incluir las combinaciones de elementos anteriores, siendo la más utilizada la de ZnS. Estas NPs también pueden ser funcionalizadas con el objetivo de mejorar su aplicación (**Figura 2**). La conjugación de péptidos con grupos tioles para favorecer la fijación de los QDs a una superficie, así como la de elementos de reconocimiento celular

para hacerlos más biocompatibles o dirigirlos a una localización celular concreta, son las funcionalizaciones más utilizadas [71,72].

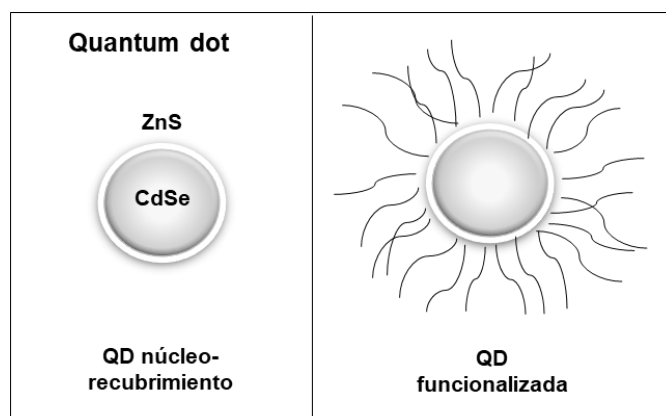


Figura 2. Representación de un QD con núcleo y recubrimiento binarios, y de la misma nanopartícula funcionalizada.

Sin duda, estas propiedades únicas de los QDs se están aprovechando actualmente en la industria tecnológica, especialmente como parte integrante de las pantallas de los dispositivos optoelectrónicos para formar diodos emisores de luz QD-LED [73]. La incorporación de QDs mejora tanto la calidad y brillo de la imagen como la vida útil del dispositivo. En este sentido, los QDs de CdSe/ZnS fueron los primeros en utilizarse gracias a su pequeño espectro de emisión y su amplia gama de colores en comparación con los espectros de emisión de los diodos emisores de luz (LEDs) utilizados normalmente. Actualmente, aunque se está intentando retirar el Cd de su composición y sustituirlo por Mn, debido a la conocida toxicidad del Cd, los QDs de CdSe/ZnS siguen empleándose como base para el desarrollo de nuevas modificaciones y funcionalizaciones que mejoren las propiedades de estas nanopartículas [74,75].

Por otra parte, estos QDs se empezaron a utilizar en aplicaciones biológicas desde 1998, empleando moléculas bioactivas para funcionalizar su superficie. Los QDs modificados permiten monitorizar eventos biológicos, rutas metabólicas o marcar

estructuras celulares concretas como ADN, peroxisomas, receptores de membrana o células completas. Además, todas estas funcionalizaciones han resultado de gran utilidad para el desarrollo de plataformas biosensoras [69,76], en aplicaciones de bioimagen, como herramientas para localizar genes específicos, e incluso como liberadores de fármacos [74,77–82]. En el campo de la biomedicina, los QDs de CdSe/ZnS poseen un papel fundamental relacionado con las técnicas de imagen *in vivo* [83]. Así, estos QDs dopados con Mn^{2+} se han utilizado en imagen de RMN, permitiendo mantener una fuerte luminiscencia durante un tiempo prolongado [76]; y dopados con ^{64}Cu se han utilizado satisfactoriamente en tomografía por emisión de positrones (PET), permitiendo, por ejemplo, visualizar la localización de un tumor en un modelo *in vivo* de ratón (*Figura 3*) [84].

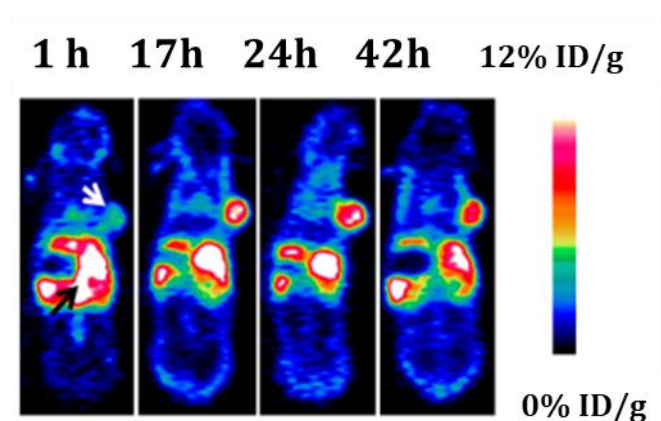


Figura 3. Imágenes obtenidas mediante PET de un tumor en un modelo *in vivo* de ratón a las 1, 17, 24 y 42 h tras la inyección intravenosa de QDs de CdSe/ZnS dopadas con ^{64}Cu . La flecha blanca señala la zona tumoral y la negra el hígado [84].

A pesar de todos los beneficios que proporcionan estos QDs, en los últimos años existe una preocupación asociada a la potencial toxicidad de los nanomateriales, incluyendo los QDs. Su variada aplicación y comercialización se traduce en la aparición de estos QDs en el medioambiente, donde ya se consideran potenciales contaminantes emergentes que podrían llegar al ser humano a través de la cadena trófica. Pero, además, la llegada de los mismos al ser humano u otros organismos puede deberse a

su aplicación en biomedicina o por contacto con la multitud de objetos que los contienen. Algunos estudios han demostrado la capacidad de los QDs para penetrar a través de la piel, especialmente cuando la barrera cutánea se encuentra deteriorada [85,86].

La controversia sobre si los QDs inducen o no toxicidad se refleja en la literatura, donde se ha evaluado el potencial tóxico de diferentes tipos de QDs en diferentes sistemas biológicos y a diferentes concentraciones. La mayoría de las publicaciones coinciden en que cada tipo de QDs tiene sus propias propiedades fisicoquímicas que determinan su potencial toxicidad, aunque de manera general, se ha observado su tendencia a acumularse en órganos como pulmón e hígado. Muchos estudios argumentan que estos QDs no son tóxicos cuando sus superficies se pasivan con recubrimientos apropiados, aunque otros estudios han demostrado su toxicidad a nivel celular, perturbando el balance oxidativo y originando disfunción mitocondrial o daño en el ADN. La toxicidad de los QDs se ha evaluado utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*, tal y como se recoge en la **Tabla 1**. No obstante, los estudios llevados a cabo hasta el momento hacen uso de ensayos de toxicidad relativamente sencillos que no permiten identificar mecanismos específicos de interacción de los QDs con las células que justifiquen los efectos citotóxicos observados. Es en este punto donde la aplicación de las técnicas ómicas puede desempeñar un papel relevante, y es por ello que este estudio constituye uno de los capítulos de la presente Tesis Doctoral.

Tabla 1. Resumen de algunos estudios *in vitro* e *in vivo* realizados para evaluar la toxicidad de diferentes tipos de QDs.

QDs	Línea celular/ modelo animal	Concentración	Toxicidad	Referencia
MPA-CdTe	Células de feocromocitoma de rata	10 µg/mL	Citotoxicidad con QDs recubiertas, 50% de viabilidad	[85]
		1 µg/mL		
CdTe	Ratón	5 mg/L	Alteración de metabolitos, ROS	[87]
	Células de cáncer de mama	0,1 a 200 µM	Citotoxicidad para 50 µM, 25% de viabilidad	[88]
CdTe/ZnS			Citotoxicidad para 50 µM, 40% de viabilidad	[88]

QDs	Línea celular/ modelo animal	Concentración	Toxicidad	Referencia
CdSe	Hepatocitos de rata	62,5 µg/mL	Citotóxico	[89]
MAA-TOPO-CdSe	Hepatocitos de rata	62,5 µg/mL	Muerte celular por fotólisis y oxidación del recubrimiento de los QDs	[89]
CdSe/ZnS	Hepatocitos de rata	1 mg/mL	Citotóxico	[77]
	Células HeLa	10 pmol QDs/ 10 ⁵ células (10 nM)	Poco efecto en viabilidad	[77]
	Ratón	20 nM y 1 µM	No hay efecto tóxico	[85]
	Blastómeros de <i>Xenopus</i>	4,2·10 ⁹ partículas/ célula	No hay efecto tóxico	[77]
	Rata	2,5 - 15 nmol	No hay efecto tóxico	[77]
CdSe/ZnS-COOH	Embriones de pez cebra, trucha arcoiris y guaraní perla	4 nM	Efecto tóxico físico	[90]
SSA-CdSe/ZnS	Células EL-4	0,4 mg/mL	No viables	[85]
		0,1 mg/mL	Decrece la viabilidad	[85]
	Ratón	0,1 mg/mL	No toxicidad <i>in vivo</i>	[85]
SSA-MUA-CdSe/ZnS	Células Vero	0,24 mg/mL	No afecta la viabilidad	[91]
PLL-CdSe/ZnS	Larva de pez cebra	0,2 – 200 µM de Cd	6% de mortalidad, diferentes tipos de malformaciones	[92]
PEG-CdSe/ZnS				
CdSe-CdS-ZnS	Macacos	25 mg/kg	Toxicidad mínima	[77]
PEG-PE- CdSe/ZnS	Blastómeros de <i>Xenopus</i>	5·10 ⁹ partículas/ célula	Viabilidad y motilidad alteradas	[77]
PD- CdSe/ZnS		2·10 ⁹ partículas/ célula	Fenotipo similar a los no inyectados	[77]
		5·10 ⁹ partículas/ célula	Viabilidad y motilidad alteradas	[77]
CdSe/ZnS PSMA	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (alga, medio marino)	0,04-1,0 nM	>0,52 nM inhibición del crecimiento en función de la dosis con producción de ROS	[93]
InP/ZnS	Embriones de <i>Gobiocypris rarus</i>	200 nM	Deformación y muerte de embriones	[94]
L-Cys y D-Cys ZnS:Mn	Células A549	4 – 32 µM	Disminución de la viabilidad	[95]

4. Compuestos metálicos: Metilmercurio

Se consideran metales pesados a aquellos elementos metálicos cuya densidad es superior a la densidad del agua. Aunque los metales pesados se encuentran de manera natural en la corteza terrestre, su presencia contribuye a la contaminación del ecosistema, algo que preocupa en todos los lugares del mundo. Además, la exposición humana a estos metales se debe principalmente al resultado de actividades antropogénicas como la minería, la producción industrial (refinerías, combustión del petróleo, plásticos, textiles, centrales nucleares, redes de transporte de energía, etc.) y el uso doméstico y agrícola de metales y compuestos que los contienen [1,96].

Muchos de estos metales, entre los que se incluyen Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Se y Zn, son micronutrientes esenciales que desempeñan funciones biológicas y fisiológicas relevantes. Por ejemplo, estos metales son constituyentes clave de enzimas y juegan un papel muy importante en reacciones bioquímicas de oxidación-reducción. Además, su deficiencia está relacionada con el desarrollo de diferentes enfermedades y síndromes. Otros metales como Al, Sb, As, Ba, Be, Bi, Cd, Sn, Sr, Ga, Ge, In, Li, Hg, Au, Pt, Ag, Pb, Tl, Te, Ti, V y U no desempeñan una función biológica concreta, pero sí inducen un efecto tóxico a determinadas concentraciones. Especialmente peligrosos son As, Cd, Cr, Pb y Hg, que incluso están clasificados como posibles carcinógenos por la EPA [1,16,96].

Dentro de estos metales, el mercurio se considera una de las sustancias más tóxicas en la naturaleza. Es un metal que pertenece a la serie de los elementos de transición de la tabla periódica, y se encuentra en la naturaleza en tres formas diferentes: como Hg elemental, en su forma iónica, o formando un derivado organometálico; cada una de estas especies posee un perfil diferente de toxicidad. A temperatura ambiente, el Hg elemental existe como un líquido que tiene una alta presión de vapor y se libera al medioambiente en forma de vapor de Hg [96]. El metilmercurio (MeHg) es la forma orgánica más tóxica y es la encontrada con más frecuencia en el medioambiente, formada como resultado de la metilación de formas inorgánicas de Hg (Hg^{2+}) [97]. La metilación química del Hg puede ocurrir en presencia de compuestos alquilados de Sn y Pb (como el trimetilplomo). Biológicamente, el Hg inorgánico puede ser metilado por microorganismos que se encuentran en el suelo y el agua.

El Hg se ha utilizado, y en algunos casos se sigue empleando, en la industria eléctrica (interruptores, termostatos, baterías), en odontología (amalgamas dentales) y en numerosos procesos industriales, incluyendo la producción de sosa cáustica, en reactores nucleares, como agente antifúngico para el procesamiento de la madera, como solvente para metales preciosos y otros reactivos, y como conservante de productos farmacéuticos [98]. La demanda industrial de Hg alcanzó su punto máximo en 1964, y comenzó a disminuir bruscamente entre 1980 y 1994, como resultado de las prohibiciones federales sobre los aditivos de Hg en pinturas, pesticidas y la reducción de su uso en baterías [99]. Aun así, el Programa de las Naciones Unidas de Medioambiente (PNUMA) estimó en 2005 una demanda de consumo total de Hg de más de 3000 toneladas al año, del que el 12% era consumo europeo. Actualmente este consumo global se encuentra en torno a 260-400 toneladas al año y se estima que baje de las 200 para el año 2025. Esta reducción significativa del consumo de Hg, se debe al compromiso de 128 países en el convenio de Minamata sobre el mercurio, firmado en octubre de 2013 y actualizado en septiembre de 2017 [100].

El ser humano está expuesto a todas las especies de Hg a través de la contaminación ambiental, la contaminación de alimentos, el cuidado dental, las prácticas médicas preventivas y las operaciones industriales y agrícolas [96]. Las principales fuentes de exposición crónica a bajos niveles de Hg son las amalgamas dentales y el consumo de mariscos y pescados, debido en este último caso al alto potencial de bioacumulación y biomagnificación del MeHg en peces de gran tamaño, aunque también puede encontrarse en cereales o carnes [101]. El Hg ingresa en el agua bien en un proceso natural de desprendimiento de gases de la corteza terrestre, o bien a través de la contaminación industrial. Se estima que la emisión antropogénica de Hg supone el 40% del total, aproximadamente [102]. Por otra parte, algas y bacterias son capaces de metilar el Hg incorporado al agua [103], y el MeHg derivado se ingiere y se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal. Aunque se pensaba que era debido a su alta solubilidad en lípidos, es su carácter catiónico lo que aumenta su solubilidad en agua, facilitando así su movilidad a través de la formación de complejos tisulares por la unión a grupos tiol de proteínas, péptidos y aminoácidos. Se ha demostrado que su incorporación a células endoteliales se realiza mediante la unión a la cisteína, formándose un complejo que imita a la estructura de la metionina (*Figura 4*). Este

complejo puede atravesar fácilmente la barrera placentaria y la hematoencefálica [104]. Además, una vez absorbido, el Hg tiene una tasa de excreción muy baja, con tiempos excreción que oscilan entre los 70 y 80 días. La excreción se realiza a través de las heces al ser complejado por el glutatión (GSH) [104]. No obstante, una gran proporción del MeHg absorbido se acumula en riñones, tejido neurológico e hígado, habiéndose demostrado también su acumulación en pelo [96,98]. Si bien todas las especies de Hg son tóxicas, el MeHg es especialmente peligroso, afectando principalmente al sistema neurológico, gastrointestinal y urinario [98].

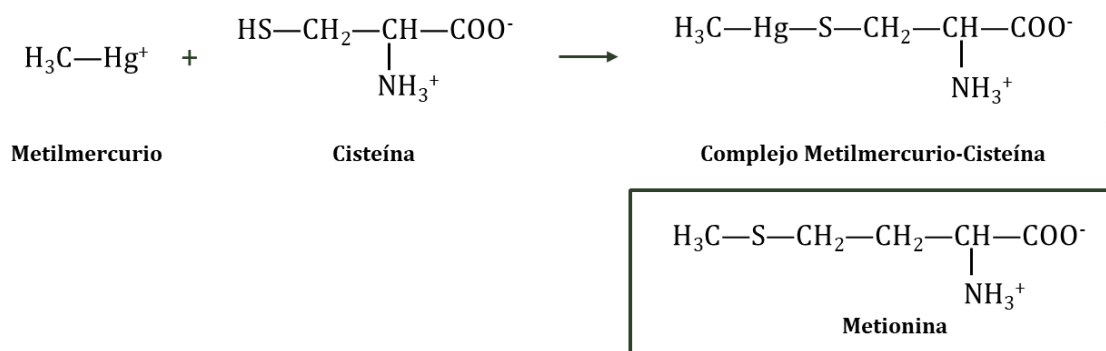


Figura 4. Reacción entre el MeHg y la cisteína que facilita la permeabilidad del MeHg a través de barreras biológicas. El complejo MeHg-cisteína posee una estructura similar a la metionina.

El caso más desastroso de envenenamiento ambiental hasta la fecha, y quizás el más ilustrativo relacionado con este compuesto metálico, ocurrió en el puerto pesquero japonés de Minamata en 1950 [105]. Una empresa química construyó una planta de plásticos que utilizaba compuestos organomercúricos como catalizadores. Como consecuencia de esta actividad, cada año se vertía una pequeña cantidad de cloruro de MeHg en el río Minamata y en la bahía adyacente de Yatsushiro. En 1953, una extraña enfermedad afectó a la población local, que se conoció como la enfermedad de Minamata. Los síntomas producidos por esta intoxicación incluían trastorno sensorial, ataxia, constricción del campo visual, alteración del habla y deterioro de la audición [106]. En 1963 se estableció que la enfermedad era causada por el MeHg presente en el alimento básico de la comunidad, el pescado extraído de la Bahía de Yatsushiro. Se

estima que más de 10.000 personas se vieron afectadas por la enfermedad de Minamata. Con un total de 703 mutilados graves y más de 100 muertos, además del nacimiento de numerosos bebés con defectos congénitos. Otro episodio conocido de envenenamiento ocurrió en Irak en la década de los 70s, debido a granos de cebada utilizados para la fabricación de pan y alimentación de perros que habían sido tratados con un fungicida que contenía MeHg [107].

A consecuencia de estos hechos, y con el fin de controlar las descargas industriales de Hg en el medio acuático, el gobierno japonés estableció regulaciones tanto para la concentración total permitida de Hg como la de MeHg. Este hecho se externalizó a otros países preocupados por el contenido de MeHg que ingerían a través de alimentos como el arroz. Un estudio reciente ha demostrado la presencia de cantidades de MeHg de 8,71 µg/kg en arroz procedente de China, muy por debajo de las concentraciones de años anteriores a 2013 donde el contenido superaba los 100 µg/kg [108].

El programa legislativo de la Unión Europea también reconoció el potencial impacto global de la contaminación por Hg estableciendo dos directivas al respecto: la 82/176/CEE y la 84/156/CEE, relativas al vertido de Hg por la industria cloroalcalina y otros sectores, respectivamente. En general, las directivas establecen normas de emisión para la calidad de los efluentes procedentes de procesos o industrias específicos, y también emiten Normas de Calidad Ambiental (NCA). Las NCA se establecen en función de la toxicidad, la persistencia y la bioacumulación, para una serie de sustancias peligrosas. La directiva sobre sustancias peligrosas (76/464/CEE) establece normas para las sustancias de la denominada lista I, en la que aparecen compuestos que, por su toxicidad, persistencia y propiedades bioacumulativas, se consideran peligrosos para el medio acuático. El Hg está incluido en dicha lista y, a día de hoy, la Directiva (2010/75/EU) establece un límite como metal disuelto en el medio acuático de 0,3 mg/L y un límite de emisión en su forma gaseosa o vapor de 0,05 mg/Nm³. El 17 de mayo de 2017 entró en vigor el nuevo reglamento 2017/852 del Parlamento Europeo, a través del cual se implementaron nuevas estrategias para reducir la demanda de Hg en aplicaciones como baterías, termómetros o amalgamas dentales. Este reglamento también recoge los límites de consumo establecidos en diferentes directivas, así como normas de almacenamiento, sanciones y la prohibición

de su uso en nuevos productos desde enero de 2018 y de su importación o exportación a partir del año 2019. El Comité Mixto formado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) ha establecido desde 2004 una ingesta tolerable provisional para el Hg total de 1,6 µg/kg de peso corporal a la semana (REP17/CF). Esta organización ha clasificado a los peces en función de su contenido en Hg, siendo el pez aguja, el reloj anaranjado, el tiburón, la caballa, el jurel y el atún aquellos que más contenido presentan, llegando incluso a tener niveles de 1 µg/g de Hg (FIPM/R978) [109].

El número de estudios toxicológicos realizados sobre los efectos del MeHg son muy abundantes, siendo probablemente el compuesto más extensamente estudiado debido a su alta peligrosidad. La **Tabla 2** recoge algunos estudios seleccionados. Muchos de estos estudios han revelado la capacidad del MeHg ingerido para interactuar con proteínas y enzimas debido a su fuerte afinidad por el azufre, causando disfunción de órganos y un efecto devastador en todo el sistema nervioso central, particularmente en el cerebro en desarrollo. En este sentido, está bien establecido que el MeHg provoca neurotoxicidad en humanos y en animales de experimentación [103,110]. Asimismo, el aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) parece ser una característica asociada a su toxicidad [111–113], que afectan especialmente a las mitocondrias desacoplando la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones [114]. Este estrés oxidativo producido por el MeHg se relaciona con su alta afinidad por los grupos tiol [111–113]. De hecho, se ha observado como el MeHg disminuye el contenido de GSH y altera las actividades de la catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa en el tejido y las células, lo que conlleva la peroxidación de lípidos y la muerte celular [114,115]. Diversos estudios que han intentado elucidar el mecanismo de toxicidad del MeHg indican que las proteínas que se han encontrado principalmente inhibidas por su efecto tóxico son: la vimentina, la familia de la tubulina, el proteasoma, la ATP sintasa, la fructosa-bisfosfato aldolasa, la familia de glutatión peroxidasa y proteínas clave implicadas en el ciclo de metilación [40,116,117].

Tabla 2. Estudios representativos sobre la toxicidad del MeHg en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Línea celular/ modelo animal	Condiciones de exposición	Concentración	Toxicidad	Referencia
Células de feocromocitoma de rata	24 h	0,1 μ M	Núcleos apoptóticos, activación de caspasa-3 e inhibición de la extensión de neuritas	[118]
Células de hipocampo de ratón	24 h	4 μ M	Disminución de la membrana, potencial y función mitocondrial. Reducción de ATP, liberación de citocromo c, activación de calpaína e interrupción lisosomal	[119]
Células madre neuronales	2 días	0,1 μ M	Reducción de la capacidad antioxidante y muerte celular	[112]
Células T reguladoras	4 h	1,25 μ M	Condensación nuclear, disminución de la integridad de la membrana y pérdida de la estructura nuclear, generación de ROS	[120]
Cultivo primario celular de cerebelo de ratón	1 h	10 μ M	Depleción de GSH, generación de ROS, mortalidad del 50% de la población	[121]
Astroцитos	1 h	10 μ M	Generación de ROS, disminución niveles de GSH	[111]
Neuronas	24 h	10 μ M	Degeneración rápida y masiva en la red de neuritas unos minutos después de la adición, muerte de todas las neuronas	[113]
<i>Plumaria elegans</i> (planta acuática)	6, 12, 24 h	0,25, 0,5 y 1 mg/L	Inhibición del crecimiento superior al 50%	[122]
<i>Elodea densa</i> (planta acuática)	25 días	0,75, 7,5 y 75 nM	Cambios morfológicos, inhibición total de la actividad mitótica de la raíz	[122]
<i>Palaemonetes pugio</i> (larva de camarón)	1 semana	12,5 μ g/L	No supervivencia de ninguna especie y capacidad de adaptarse al medio	[122]
<i>Gourami azul</i> (pez)	48 h	94,2 μ g/L	Mortalidad de un 50% de la población	[122]
Trucha arcoiris (pez)	48 h	45 μ g/L	Mortalidad de un 50% de la población	[122]
Codorniz japonesa (ave)	14 días	11 mg/kg	Mortalidad de un 50% de la población	[122]
<i>Eisenia foetida</i> (Gusano)	12 semanas	5 mg/kg (en suelo)	79% de supervivencia, no regeneran segmentos amputados	[122]

Línea celular/ modelo animal	Condiciones de exposición	Concentración	Toxicidad	Referencia
Visón (mamífero)	25 días	5 mg/kg/día	Ataxia, pérdida de equilibrio, anorexia y pérdida de peso	[122]
	29 días		Parálisis, temblores y muerte	[122]
Rata (mamífero)	24 días	4 mg/kg/día	Efectos neurológicos, ataxia y acumulación en el cerebro	[123]
Ratón sueco albino (mamífero)	21 días	15 mg/L (en agua)	Inhibición de la absorción de glutamato y aumento de los niveles de hidróperóxido	[118]
Rata <i>Sprague-Dawley</i> (mamífero)	24 h	5 µg/g (inyección subcutánea)	Aumento de la liberación de citocromo c, aumento de la proteína Bax y activación de caspasa-9 y caspasa-3	[124]
Rata <i>Wistar</i> machos (mamífero)	5 días	8 mg/kg/día	Inhibición de la cadena de transporte electrónico, liberación citocromo c, generación de ROS, activación caspasa-3	[114]

El estudio de la toxicidad del Hg está muy ligado al papel del selenio como elemento protector frente a dicha toxicidad. El Se es un elemento esencial con características antioxidantes que se encuentra en una gran variedad de especies inorgánicas y orgánicas, participando en importantes procesos bioquímicos y fisiológicos, incluidos la biosíntesis de la coenzima Q, la regulación de los flujos de las membranas, el mantenimiento de la integridad de las queratinas, la estimulación de la síntesis de anticuerpos y la activación de la proteína glutatión peroxidasa en respuesta al estrés oxidativo. Además, las selenoproteínas y selenoenzimas circulantes poseen un papel clave en la modulación del sistema inmune y en el metabolismo de la hormona tiroidea. La FAO/OMS/IAEA (Agencia Internacional de Energía Atómica) (2004) recomienda la ingesta de 34 µg/día en hombres de 65 kg y 26 µg/día en mujeres de 55 kg para obtener las reservas adecuadas de Se que necesita un organismo. Los alimentos que más contenido de este elemento tienen son los cereales, carnes, huevos y pescado. Además, este elemento tiene una larga historia en quimioprevención de cánceres de mama y colon en modelos de roedores, y se ha mostrado prometedor en el tratamiento del cáncer de próstata y otros cánceres humanos [125].

Entre estas propiedades, diversos estudios han demostrado que el Se tiene un efecto protector contra el daño inducido por determinados metales como el Cd [126–128] y, muy especialmente, el Hg [129]. Muchos estudios han evaluado los efectos protectores del SeO_3^{2-} sobre la toxicidad inducida por Hg o MeHg, ya que la afinidad del Hg por el Se es incluso superior que por el S. Se ha demostrado que ejerce un efecto protector contra los daños neurológicos asociados al MeHg [130], aunque para que el efecto protector sea efectivo, la ingesta de este elemento esencial debe ser muy superior a la de MeHg [131]. Este mecanismo de protección incluye la capacidad del Se para perturbar la redistribución del Hg en órganos y fluidos biológicos, e inducir la unión de los complejos Hg-Se-S inertes. En general, diversos estudios están de acuerdo en que el Se, y concretamente las selenoproteínas, pueden tener dos papeles importantes en la protección contra la toxicidad de Hg. En primer lugar, permiten unir más Hg a través de su grupo selenol altamente reactivo, disminuyendo incluso la cantidad de MeHg acumulada en diferentes organismos vivos, animales o plantas y, de manera adicional, sus propiedades antioxidantes ayudan a eliminar las especies reactivas de oxígeno inducidas por el Hg *in vivo* [132–138].

Tal y como se ha comentado anteriormente, la toxicidad del MeHg y la interacción Hg-Se, han sido ampliamente estudiadas. Aunque la mayor parte de estos estudios hacen uso de técnicas analíticas y bioanalíticas relativamente sencillas, en algunos casos se han empleado técnicas genómicas y proteómicas de análisis masivo que han permitido elucidar parte de los mecanismos asociados a la toxicidad de este compuesto. No obstante, a nivel de metabolismo no se han llevado a cabo estudios hasta la fecha. Por este motivo, en la presente Tesis Doctoral se ha abordado el estudio de la toxicidad del MeHg, así como de la interacción MeHg-Se, empleando técnicas de metabolómica dirigida y no dirigida, con objeto de evaluar las rutas metabólicas implicadas, y ampliar así el conocimiento actual sobre las bases moleculares de la toxicidad asociada a este elemento.

5. Compuestos orgánicos: Surfynol

Los surfactantes, también llamados agentes activos de superficie o tensioactivos, son un grupo de compuestos orgánicos con una composición química particular: poseen una parte hidrofílica formada por uno o varios grupos polares, soluble en medios polares, y una parte hidrofóbica formada por una cadena hidrocarbonada, soluble en medios apolares. Los surfactantes se caracterizan por su tendencia a la adsorción a diferentes tipos de superficies o interfases, además de por su habilidad para formar micelas en disolución. Estos compuestos pueden clasificarse en función de la carga de sus moléculas en catiónicos, aniónicos o no-iónicos [139,140].

Debido a estas propiedades, los surfactantes se aplican en diferentes productos de uso cotidiano; por ejemplo están presentes en productos de limpieza, champús, desinfectantes, antisépticos, tintes, pinturas, agentes dispersantes, agentes humectantes, emulsionantes, cosméticos, ropa, etc. También se emplean en la industria del papel y como ingredientes de productos derivados de petróleo y pesticidas [6,139].

El uso de surfactantes en toda esta gama de aplicaciones se traduce en la aparición de dichos compuestos en residuos sólidos y en aguas residuales. Se han realizado numerosas evaluaciones sobre la presencia medioambiental de surfactantes en agua y tierra de muchos países, confirmándose su presencia y, por tanto, su contribución a la contaminación del medioambiente. Además, sus propiedades superficiales les hacen ser considerados compuestos potencialmente tóxicos, especialmente en ambientes acuáticos, ya que pueden interaccionar con superficies biológicas tales como las membranas celulares. Diversos trabajos de investigación han demostrado la toxicidad de estos surfactantes, si bien existe una carencia de aplicación de las técnicas ómicas para elucidar los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos tóxicos observados [6,16,140,141].

El 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol (TMDD), comercialmente conocido como Surfynol, es un surfactante no-iónico cuya estructura se representa en la **Figura 5**. Los diferentes etoxilados posibles de este compuesto dan lugar a los diferentes tipos de Surfynol existentes. Este surfactante se encuentra dentro del grupo de adhesivos “respetuosos con el medioambiente”, ya que se encuentra fabricado a base de agua.

Estos adhesivos se empezaron a sintetizar para sustituir a aquellos que, como el clorofluorometano y el hidroclorofluorometano, generaban una alta emisión de CO₂ y halógenos a la atmósfera [11,142].

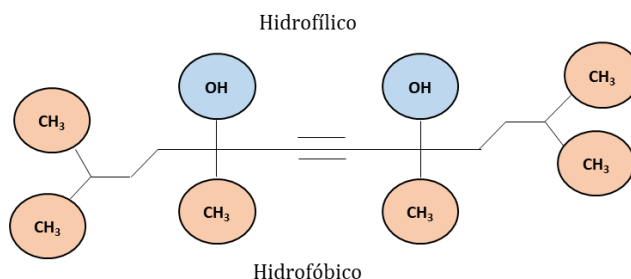


Figura 5. Estructura molecular del tensioactivo Surfynol.

El Surfynol presenta unas propiedades características que lo diferencian de otros tensioactivos a base de agua como son: la capacidad de reducir la tensión superficial, su excelente papel como agente humectante y su poder para evitar la formación de espumas [142]. Por ello, se emplea en la fabricación de numerosos productos industriales como tintes, pinturas, recubrimientos y adhesivos. Su presencia resulta especialmente relevante en la industria de empaquetado de alimentos, donde el surfactante no es aplicado en la superficie que se encuentra en contacto con el alimento, pero sí tras la capa de plástico de la estructura multicapa del envase.

Los estudios experimentales que evalúan la toxicidad de este surfactante son prácticamente inexistentes, en estos escasos trabajos se recogen datos de su presencia en ríos y los efectos que la exposición a este compuesto produce en larvas de pez cebra [11,143,144]. Por ello, la EFSA lo ha clasificado, utilizando la aproximación teórica del umbral de alarma toxicológica (TTC, de sus siglas en inglés) [145,146], como un compuesto de Clase III de *Cramer*, es decir, el nivel más alto de toxicidad, según el cual la concentración de Surfynol no puede superar los 90 µg/kg de alimento envasado. El TTC permite evaluar la toxicidad de un compuesto cuando no se cuenta con datos experimentales, empleando exclusivamente los datos estructurales de la molécula, lo que llevaría a considerarlo seguro para la salud si el consumo humano del compuesto se sitúa por debajo del umbral establecido. El Surfynol se incorporó en el mercado en

2010 y se adicionaba en cantidades muy pequeñas. Sin embargo, el mercado ha evolucionado y los materiales de empaquetado contienen cada vez más cantidad de este surfactante sustituyendo a los adhesivos de poliuretano. Un estudio de migración demostró la presencia de Surfynol a una concentración de 621,0 µg/kg de alimento en un simulante sólido conocido como *Tenax* [147]. Estudios adicionales han demostrado que la migración del Surfynol desde el envase al alimento sucede a través de las diferentes capas que conforman el envase, incluso a través del plástico o del papel [148,149]. Esta migración también se ha demostrado en envases cuya finalidad era el almacenamiento de esperma [150].

En base a estos estudios que han corroborado la migración de este surfactante a alimentos de consumo humano, y a la prácticamente total escasez de estudios toxicológicos sobre este compuesto, en la presente Tesis Doctoral se aborda este tema, para lo cual se han empleado conjuntamente técnicas de proteómica y metabolómica que han permitido poner de manifiesto el potencial efecto tóxico de este tensioactivo, así como los principales mecanismos moleculares responsables del mismo.

OBJETIVOS

A decorative graphic consisting of two thin white lines intersecting at a right angle. One line is horizontal, extending from the left edge of the page towards the right, and the other is vertical, extending from the top edge towards the bottom. They intersect at a point located to the right of the word 'OBJETIVOS'.

El objetivo genérico de esta Tesis Doctoral es la elucidación de los mecanismos moleculares de acción de compuestos tóxicos de diferente naturaleza, como complemento a estudios toxicológicos convencionales, a través de la identificación de proteínas y metabolitos cuyos niveles de expresión se ven alterados en células y organismos expuestos a dichos agentes.

Este objetivo general se aborda a través de varios objetivos específicos que se describen a continuación:

- **Objetivo 1: Desarrollo de métodos analíticos.** Este objetivo persigue desarrollar métodos analíticos de preparación de muestra, concretamente métodos de extracción de metabolitos y proteínas, que permitan la aplicación de técnicas ómicas establecidas a los diversos estudios de toxicidad seleccionados en la presente Tesis Doctoral.
- **Objetivo 2: Evaluación de la toxicidad y de los mecanismos moleculares asociados a la exposición a nanopartículas QDs de CdSe/ZnS.** Mediante este objetivo se pretende evaluar, en primer lugar, cómo se ve afectada la viabilidad

de distintas líneas celulares tras ser expuestas a diferentes concentraciones de estas nanopartículas de 6 nm de diámetro, y cómo, dicha exposición, afecta a la inducción de apoptosis y a cambios en el perfil del ciclo celular. Por otra parte, también se pretende evaluar la capacidad de internalización celular de estos QDs y su estabilidad y localización intracelular. Por último, y como aspecto más relevante, se persigue la elucidación de los mecanismos de toxicidad asociados a la exposición a estos QDs, empleando tanto un modelo *in vitro* como uno *in vivo*, para lo que se utilizan las técnicas de proteómica cuantitativa conocidas como SILAC y super-SILAC, respectivamente.

- **Objetivo 3: Evaluación de los cambios metabólicos asociados a la toxicidad inducida por MeHg y de la capacidad protectora del Se(IV) frente a dichos cambios.** En este objetivo se utiliza la metabolómica dirigida y no dirigida para completar estudios de toxicidad previos realizados a nivel de proteómica y genómica, con objeto de profundizar a otro nivel molecular en los mecanismos asociados a la toxicidad del MeHg. Además, empleando estas mismas técnicas analíticas, se pretende demostrar el papel protector que puede ejercer el Se(IV) frente a dicha toxicidad.
- **Objetivo 4: Estudio del potencial reprotóxico del tensioactivo Surfynol.** Mediante este objetivo se pretende demostrar la reprototoxicidad del Surfynol presente como adhesivo en numerosos empaquetados alimentarios, mediante la realización de estudios de viabilidad celular utilizando células germinales NTERA2 y mediante la elucidación de los mecanismos de toxicidad asociados a dicho compuesto. Para este último propósito, se recurre a la utilización de una estrategia multi-ómica. Por otro lado, se pretende demostrar la citotoxicidad de este compuesto en líneas celulares somáticas mediante ensayos de viabilidad celular y de inducción de apoptosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se describen los materiales y métodos empleados en los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral. Los fundamentos teóricos de las técnicas y métodos analíticos descritos en este capítulo se incluyen en el anexo I.

1. Cultivo celular

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han utilizado las siguientes líneas celulares adquiridas en la American Type Culture Collection (ATCC): células de hepatocarcinoma humano (HepG2), células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa), células de neuroblastoma de ratón (Neuro-2a), macrófagos de ratón (Raw), queratinocitos humanos (HaCaT), células embrionarias de riñón humano (Hek293), células de osteosarcoma humano (Hos), células de fibroblasto de embrión de pez cebra (ZF4), células de fibroblasto de cola de pez cebra (AB.9) y células germinales de carcinoma embrionario testicular humano (NTERA2). Todas ellas son células de tipo adherente y se cultivaron en un incubador New Brunswick Galaxy 48S que permitió

mantener las condiciones óptimas para la proliferación de las diferentes líneas celulares: 37 °C y 5% de CO₂, salvo en el caso de las líneas ZF4 y AB.9 que se cultivaron a 28 °C. Las células se crecieron empleando medio de cultivo Dulbecco's modified eagled medium (DMEM, Gibco) y DMEM:F12 (Gibco) para la línea ZF4 suplementado en todos los casos con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, Gibco) y un 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich).

2. Ensayo de viabilidad celular

El estudio de la viabilidad de las diferentes líneas celulares, tras la exposición a los contaminantes de interés, se llevó a cabo mediante el denominado ensayo MTT. En primer lugar, se realizó el cultivo de la línea celular seleccionada en placas de cultivo multipocillo P96 con una densidad de población celular de 4·10³ células/pocillo. Tras 24 h, y una vez asentadas las células, se incubaron con el compuesto potencialmente tóxico empleando las condiciones de concentración y tiempo seleccionadas y descritas posteriormente para cada caso. Transcurrido el tiempo de exposición, se adicionaron a cada pocillo 20 µL del reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (Invitrogen) preparado a una concentración de 5 mg/mL, y se incubó a 37 °C durante 4 h. A continuación, se retiró el medio de cultivo con cuidado y se adicionaron 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich) para disolver los cristales de formazán, originados como consecuencia de la reducción del reactivo MTT en los pocillos que contenían células viables. Por último, se realizó la medida de absorbancia a 595 nm en un lector de placas multipocillo Sunrise (Tecan). El cálculo de la viabilidad celular se obtuvo aplicando la **Ecuación 1**.

$$Viabilidad (\%) = \frac{Abs_{muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{control} - Abs_{blanco}} \cdot 100$$

Ecuación 1

2. a Condiciones de exposición a QDs

Para evaluar la viabilidad celular tras la exposición a QDs de CdSe/ZnS de 6 nm de diámetro (Sigma Aldrich) se emplearon quintuplicados de diferentes líneas celulares (HepG2, HeLa, Neuro-2a, Raw, HaCaT, Hek293 y Hos) que se expusieron a concentraciones de QDs de 10, 50 y 100 mg/L durante 24, 48 y 72 h. De igual forma, se evaluó la viabilidad de células HepG2 expuestas a 10,09 mg/L de Cd²⁺ y a 2,74 mg/L de Se²⁻ [151], utilizando para ello las sales de CdCl₂ y Na₂Se.

2. b Condiciones de exposición a Surfynol

Este estudio de viabilidad se llevó a cabo empleando células NTERA2, HepG2 y HeLa. En este caso se testaron concentraciones de exposición en el rango 0,1-50 mg/L durante un tiempo de 72 h en cinco réplicas de cada condición.

3. Microscopía de epifluorescencia

La cinética de internalización de los QDs en células se llevó a cabo mediante microscopía de epifluorescencia empleando la capacidad fotoluminiscente ($\lambda_{em} = 630$ nm) de los QDs. Para ello, se realizó una preparación de muestra con el cultivo de la línea celular HepG2, sobre cristales de microscopía, en placas de cultivo de 24 pocillos. Las células se expusieron a 50 mg/L de QDs a diferentes tiempos: 0, 1, 12, 24, 48 y 72 h. Una vez terminada la incubación con los QDs, se retiró el medio y se realizaron dos lavados con 2 mL de una disolución reguladora de fosfato salina (PBS, Lonza). Posteriormente, se adicionaron 2 mL de paraformaldehído (Sigma Aldrich) al 4% (p/v) y se incubaron los cristales durante 15 min a temperatura ambiente con el fin de fijar las células y conservarlas. Transcurrido este tiempo, los cristales se lavaron tres veces con 2 mL de PBS durante 5 min cada lavado. A continuación, los cristales se incubaron durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente con 30 μ L de una disolución de fluorocromos preparada a partir de: 0,75 μ L de 4'6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen) (1 mg/mL) ($\lambda_{ex} = 360$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm), 15 μ L de

faloidina alexa 488 (Invitrogen) ($\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 519 \text{ nm}$) y 745 μL de PBS. Posteriormente, se retiró el exceso utilizando 3 veces PBS en las mismas condiciones anteriores y, por último, se fijó cada uno de los cristales sobre un portaobjetos empleando 5 μL de Mowiol® 4-88 (Sigma Aldrich). Hasta la realización de la medida se mantuvieron las muestras a 4 °C en oscuridad. Las imágenes se recogieron con un microscopio de epifluorescencia Motic AE31 equipado con una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) y un objetivo de 60 aumentos. El software Motic Images Advance 3.2 permitió la adquisición y el posterior procesamiento de las imágenes.

4. Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se utilizó para evaluar la localización de los QDs de CdSe/ZnS en el interior de los diferentes orgánulos de células HepG2. Para ello, se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEOL 2100 operando a 100 kV. Las células se trataron con 50 mg/L de QDs durante 72 h a 37 °C. Tras la exposición, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 4 h con glutaraldehído (Sigma Aldrich) al 2,5% (v/v) y p-formaldehído al 4% (v/v) con el objetivo de fijar las células *in-situ*. Posteriormente, las células se lavaron y almacenaron toda la noche en PBS a 4 °C. Transcurrida una hora de exposición en oscuridad con tetraóxido de osmio al 1% (v/v), que proporciona contraste a la célula, éstas se deshidrataron en etanol (Scharlab). Para el proceso de deshidratación se utilizaron disoluciones de etanol desde el 30 al 100% (v/v). A continuación, los pellets se trataron con cantidades crecientes de la mezcla resina: acetona hasta llegar al 100% (v/v) de resina. Finalmente se incubaron a 65 °C durante 48 h, para posteriormente ser cortadas en secciones ultrafinas, transferidas a rejillas de cobre y analizadas mediante TEM y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS).

5. Citometría de flujo

La citometría de flujo se ha empleado en la presente Tesis Doctoral para evaluar posibles alteraciones en el ciclo celular e inducción de apoptosis debida a la exposición de los diferentes contaminantes estudiados.

5. a Evaluación del ciclo celular

Para evaluar cómo afectan los QDs de CdSe/ZnS al perfil del ciclo celular, se cultivaron células HepG2 en placas de cultivo P60 que se expusieron a 0, 10, 50 y 100 mg/L de QDs durante 72 h. Transcurrido este tiempo, se tomó un volumen equivalente a $1 \cdot 10^6$ células y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Tras centrifugar las muestras durante 5 min a 1200 rpm y 22 °C se descartaron los sobrenadantes. El pellet celular se resuspendió en 250 µL de PBS sobre los que se adicionaron otros 250 µL de una disolución al 60% (v/v) de etanol en PBS y 30 µg/mL del reactivo Hoescht 33342 (Invitrogen). Posteriormente, se dejó incubar la mezcla toda la noche a 4 °C en oscuridad. Al día siguiente, se transfirieron a un tubo de citometría y se realizó la medida en un citómetro LSR (Becton Dickinson). Se realizó el estudio estadístico de los datos para encontrar diferencias significativas entre las cinco réplicas realizadas de muestras control y muestras tratadas a las diferentes concentraciones de los QDs. Esta comparación se llevó a cabo mediante análisis estadístico de la varianza de un factor (ANOVA), con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

5. b Ensayo de apoptosis

Para evaluar la capacidad de inducir apoptosis del Surfynol en células somáticas (HepG2 y HeLa), éstas se expusieron a 20 mg/L de dicho tensioactivo durante 72 h. Tras el tiempo de exposición, las células se lavaron con PBS y su pellet se resuspendió en 1 mL de la disolución de anexina-V (annexin binding buffer, Invitrogen) a pH 7,5 que contiene: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-metanosulfónico (HEPES) (100 mM), NaOH (100 mM), NaCl (1,4 M) y CaCl_2 (25 mM) (Sigma Aldrich). Las células apoptóticas

y necróticas se marcaron con 5 μ L del conjugado de anexina V-isotiocianato de fluoresceína (FITC, Invitrogen) y 10 μ L de yoduro de propidio (PI, Invitrogen). Transcurridos los 15 min de incubación en oscuridad, las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson) empleando como fuente de excitación un láser de argón-ion 15 mV a una longitud de onda de 488 nm. En estas condiciones, las células vivas no emitieron fluorescencia, las apoptóticas emitieron en color verde (FITC) y las necróticas en verde y azul (PI). Para el tratamiento estadístico de los datos, se realizaron triplicados tanto de las células control como de las células expuestas a Surfynol, y se estimaron las posibles diferencias estadísticamente significativas mediante el empleo del estudio estadístico de la t de Student con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

6. Proteómica cuantitativa

Para la elucidación de mecanismos biomoleculares afectados y responsables de los efectos tóxicos observados tras la exposición a los diferentes contaminantes, se han empleado dos estrategias de proteómica cuantitativa: la estrategia SILAC, aplicable a modelos *in vitro*, y una modificación de ésta denominada super-SILAC y que permite su aplicación a modelos *in vivo*.

6. a Stable isotopic labeling by amino acids in cell culture (SILAC)

La estrategia SILAC se ha empleado para identificar proteínas alteradas como consecuencia de la exposición a los QDs y al Surfynol, con el fin de identificar y profundizar en los mecanismos biomoleculares implicados en la toxicidad inducida por ambos compuestos. El esquema del procedimiento experimental seguido para implementar la estrategia SILAC en ambos casos se muestra esquematizado en la **Figura 6**.

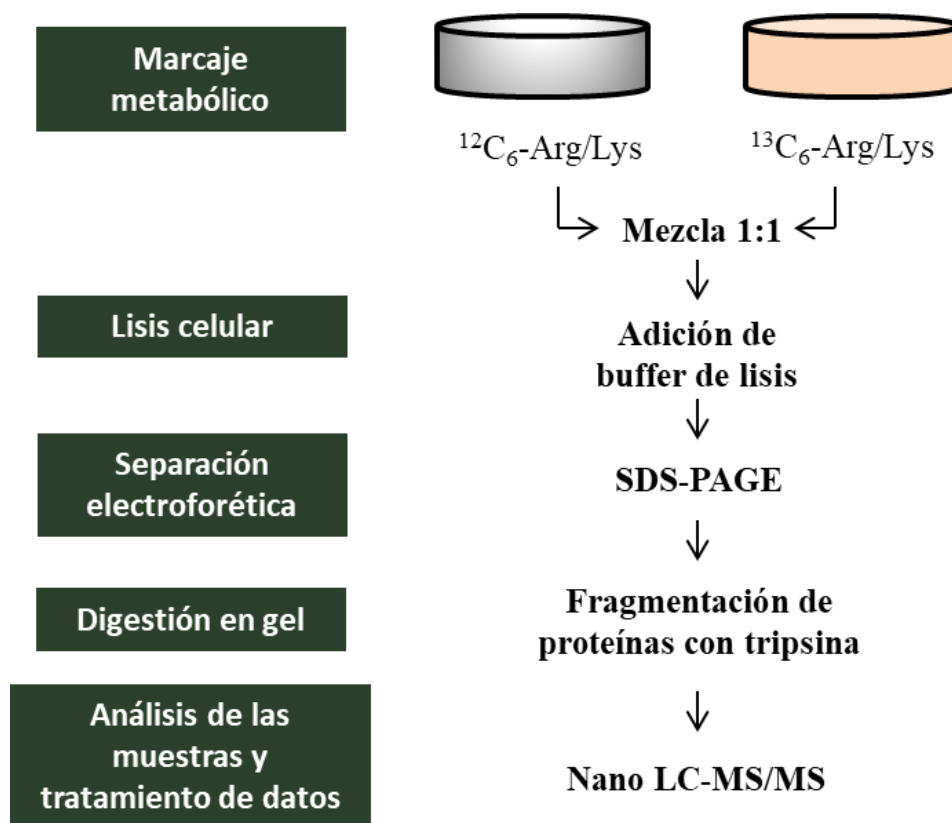


Figura 6. Esquema de las diferentes etapas del procedimiento empleado en los experimentos SILAC.

6. a. 1 Marcaje metabólico

Se sembraron $1 \cdot 10^6$ células en una placa Petri con 10 mL de DMEM suplementado con 10% (v/v) de FBS dializado y 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina. Paralelamente, se realizó un cultivo en iguales condiciones, pero empleando el medio DMEM conteniendo la versión pesada de los aminoácidos lisina (Lys) y arginina (Arg) marcados isotópicamente con ^{13}C , este medio se conoce como “pesado” mientras el que contiene a los aminoácidos sin modificar se conoce como “ligero”. En esta etapa del procedimiento, es muy importante que las células crezcan en el medio pesado durante un mínimo de 5-6 doblajes, para asegurar un 100% de eficacia de marcaje. Una vez concluido el marcaje metabólico de las células, se llevó a cabo la exposición de las mismas con las condiciones seleccionadas para cada uno de los contaminantes estudiados: células HepG2 expuestas a 50 mg/L de QDs durante 72 h; y células NTERA2

expuestas a 20 mg/L de Surfynol durante 72 h. En ambos casos y para asegurar la reproducibilidad de los resultados, se realizaron paralelamente dos experimentos: un SILAC directo, en el que el contaminante a estudiar se adicionó a las células crecidas en el medio ligero; y un SILAC reverso, en el que el compuesto a evaluar se adicionó a las células crecidas en el medio pesado. Tras la exposición, las células control y las expuestas se mezclaron en una relación 1:1.

6. a. 2 Lisis celular

El proceso de lisis se realizó a 4 °C para minimizar el efecto de las proteasas intracelulares y la degradación de las proteínas. En primer lugar, se tomó la placa confluyente, se retiró el medio y se lavó dos veces con PBS frío para eliminar el resto de proteínas del FBS. Después, se añadieron 500 µL de la disolución de lisis total (tris-HCl pH 7,5 (20 mM), MgCl₂ (5 mM), NaF (50 mM), EDTA (10 mM), NaCl (0,5M), Tritón x100 (1% (v/v)) e inhibidores de proteasas) y se levantaron las células adheridas a la superficie con un rascador. Se transfirieron a un tubo de centrifuga de 1,5 mL, y se sonicaron con microsonda de ultrasonidos (US) aplicando 20 pulsos de 2 s con 5 s entre cada pulso. Posteriormente, la suspensión se incubó durante 15 min a 4 °C con agitación rotatoria. Finalmente, se centrifugó a 13.000 rpm y 4 °C durante 10 min para eliminar los restos celulares (debris celular) y se traspasó el sobrenadante, conteniendo el extracto proteico, a un tubo nuevo de microcentrífuga.

6. a. 3 Separación electroforética

En primer lugar, se empleó el ensayo Bradford para determinar la cantidad de proteína total en la muestra. Los patrones de concentración conocida que se emplearon para realizar el calibrado consistieron en disoluciones de albúmina de suero bovina (BSA, Biorad). En este ensayo, el reactivo Bradford (Biorad) se enlaza a las proteínas por fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas, estabilizando la carga negativa del colorante y originando el color azul cuya absorbancia puede ser medida a 595 nm.

El extracto proteico, obtenido tras la lisis celular, se mezcló en proporción 1:1 con el tampón de carga (Laemmli sample buffer, Biorad), al que se adicionó un 4% (v/v) de 2-mercaptoetanol (β -ME, Sigma Aldrich) como agente reductor. La muestra se calentó a una temperatura próxima a la de ebullición (95 °C) para conseguir la reducción de los enlaces disulfuro inter- e intra-catenarios, destruyendo así el plegamiento terciario de las proteínas. La electroforesis en gel de poliacrilamida con docecilsulfato sódico (SDS-PAGE), en geles del 10% de entrecruzamiento, se llevó a cabo en una primera etapa a 12 mA (80 V) durante 20 min, tras la cual se subió la corriente a 20 mA (120 V) hasta que el frente de disolvente alcanzó el final de la cubeta. Una vez finalizada la separación, y antes de proceder a la tinción del gel, se fijaron las proteínas para evitar su posible pérdida por difusión, especialmente en el caso de proteínas de bajo peso molecular. Como disolución de fijado se utilizó 7,5% (v/v) de ácido acético (Scharlab) y 30% (v/v) de etanol durante 30 min con agitación suave. Posteriormente se eliminó dicha disolución, se lavó con agua de calidad MS y se incubó con el colorante Coomassie Brilliant Blue (CBB, Thermo Scientific) durante 30 min y agitación suave. Pasado este tiempo, se procedió a desteñir el gel con una disolución al 30% (v/v) de etanol hasta visualización correcta de las bandas (aproximadamente 2 h).

6. a. 4 Digestión en gel

Una vez realizado el proceso de fijación, tinción y destinción comentados anteriormente, se cortó cada carril del gel en 22 bandas con objeto de realizar una digestión trípica de las proteínas en el gel. En este caso, no se seleccionaron únicamente las bandas visibles, sino que se cortó todo el carril completo para así obtener el mayor número de proteínas identificadas y cuantificadas posible. Previo a la digestión, se procedió a la completa eliminación del CBB de las bandas mediante lavados sucesivos con 25 mM NH_4HCO_3 (Sigma Aldrich) y acetonitrilo (ACN, Fisher Scientific) al 50% (v/v). Este proceso es necesario para evitar interferencias del CBB en la etapa de medida. Seguidamente, cada banda se cortó en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 mm² con la ayuda de un bisturí y se deshidrataron completamente mediante la adición de ACN y posterior centrifugación a vacío. Esta etapa de aumento

de superficie de las bandas y de deshidratación se realizó para facilitar tanto la penetración de la enzima proteolítica empleada para digerir las proteínas, como la posterior extracción de los péptidos generados. Todas estas etapas se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar con objeto de evitar contaminación de las muestras por queratinas u otras sustancias del ambiente.

La digestión de las proteínas se llevó a cabo adicionando 40 μL de tripsina (Promega) a una concentración de 12,5 ng/ μL preparada en 25 mM NH_4HCO_3 . La digestión se llevó a cabo durante 16 h a 37 °C y agitación suave. La tripsina es una enzima altamente selectiva que fragmenta las proteínas tras los residuos de Lys y Arg. Una vez terminada la digestión, se inactivó la tripsina restante congelando la muestra a -80 °C. La última etapa del proceso de digestión consistió en la extracción de los péptidos generados, utilizando para ello una extracción secuencial con una disolución de ácido fórmico (AF, Sigma Aldrich) al 5% (v/v) y otra de ACN al 100% (v/v). El uso de manera alternada de estas disoluciones (hidratante y deshidratante) junto con la sonicación y la agitación a 700 rpm y 37 °C, permitió expandir y contraer los poros del gel y así facilitar la salida de la mayor parte de los péptidos generados. El extracto final de péptidos, obtenido combinando los extractos de las diferentes extracciones, se llevó a sequedad mediante centrifugación a vacío y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

6. a. 5 Análisis por nanocromatografía de líquidos y espectrometría de masas

En el momento del análisis, las muestras congeladas de los extractos peptídicos se resuspendieron en 15 μL de una disolución al 2% (v/v) de ACN y 0,1% (v/v) de AF. Las muestras se sonicaron durante 10 min en un baño de ultrasonidos para favorecer la redisolución de todos los péptidos. Se inyectaron 5 μL de cada muestra mediante un inyector automático en un sistema de nano-cromatografía líquida equipado con: (i) una precolumna de C18 de 300 μm de diámetro interno y 10 mm de longitud (Thermo Scientific), y (ii) una columna analítica de C18 de 75 μm de diámetro interno y 15 cm de longitud (Thermo Scientific). La salida de la columna analítica se conectó on-line al nanocapilar de acero (emitter) de la fuente de ionización por electrospray (ESI) del espectrómetro de masas utilizado. La separación de los péptidos se realizó a un caudal

de 200 nL/min con un gradiente cromatográfico que comenzó en un 95% de fase A (95% H₂O, 5% ACN, 0,1% AF) hasta alcanzar un 80% de fase B (100% ACN, 0,1% AF) en 120 min.

Los péptidos procedentes de la columna cromatográfica se escanearon y fragmentaron en una trampa iónica lineal LTQ XL (ThermoFinnigan) operando en modo *data-dependent ZoomScan* y MS/MS en modo *switching* para los tres picos precursores más intensos detectados en *scan survey* entre 400 y 1600 uma. La ventana de los *ZoomScans* se fijó en 12 Da, lo que permitió visualizar las diferencias isotópicas de la mayoría de péptidos con carga +2 y +3 y ¹²C/¹³C. Los péptidos con carga +1 no se consideraron válidos. La energía de colisión (CE) normalizada se fijó en un 35% y se aplicó una exclusión dinámica durante 3 min para evitar la fragmentación repetitiva de iones.

6. a. 6 Análisis de datos y estudios estadísticos

Una vez obtenidos los cromatogramas y los espectros de MS y MS/MS (raw files), se emplearon diferentes softwares para la identificación y cuantificación de las proteínas. En primer lugar, se generaron los archivos .mgf (Mascot generic files) mediante BioWorks, que se utilizaron posteriormente en el motor de búsqueda MASCOT (versión 2.3 Matrix Science) para la identificación de proteínas, empleando la base de datos *Homo sapiens* del NCBI (National Center for Biotechnology Information) conteniendo un total de 35.586 secuencias (31/01/15). Los criterios de búsqueda incluyeron la especificidad de la tripsina como enzima de digestión, un missed-cleavage permitido y, como modificaciones variables, la oxidación de metionina y la presencia de ¹³C₆-Arg y ¹³C₆-Lys. Se utilizaron tolerancias de masa de precursores y de fragmentos de iones de 1,2 y 0,3 Da, respectivamente.

Cada proteína se cuantificó empleando el cociente SILAC (R_{SILAC}) que relaciona las áreas de los diferentes péptidos pesados de una misma proteína procedentes de la muestra marcada con ¹³C₆-Arg y ¹³C₆-Lys, con las áreas de los mismos péptidos ligeros pero procedentes de la muestra sin marcar (**Ecuación 2**). La obtención de las áreas para cada péptido y la cuantificación de las proteínas se realizó mediante el software Quixot

(versión 1.3.26). No obstante, todas las áreas integradas se verificaron manualmente empleando los *ZoomScans*. El cálculo del cociente SILAC (R_{SILAC}) para cada proteína se realizó con el software Excel 2010 aplicando la **Ecuación 2**, donde A_P representa las áreas de los péptidos pesados, A_L las áreas de los péptidos ligeros, y n el número de péptidos cuantificados para la proteína en cuestión.

Los procesos biológicos y la localización subcelular de las proteínas identificadas por SILAC se asignaron en base al conocimiento biológico disponible en las anotaciones de la base de datos Gene Ontology (GO).

$$R_{\text{SILAC}} = \frac{\frac{A_{p1}}{A_{L1}} + \frac{A_{p2}}{A_{L2}} + \dots + \frac{A_{pn}}{A_{Ln}}}{n}$$

Ecuación 2

6. b Super-SILAC

A pesar de que la estrategia SILAC comentada anteriormente es la técnica de cuantificación relativa de proteínas más exacta y precisa existente hasta la fecha, su principal limitación reside en la imposibilidad o en el alto coste que supondría marcar organismos enteros con amino ácidos marcados isotópicamente. Con objeto de solventar este problema, hace unos años se diseñó la estrategia llamada super-SILAC, que sí permite comparar dos tejidos/organismos de forma indirecta, empleando para ello una mezcla de proteínas marcadas y relacionadas con el tejido/organismo que se quiere estudiar, denominada “mezcla super-SILAC”, que actúa como estándar interno y que permite obtener unos $R_{\text{super-SILAC}}$ finales que sí relacionan directamente la expresión de proteínas entre dos tejidos/organismos objeto de estudio.

Esta técnica se empleó para identificar proteínas alteradas como consecuencia de la exposición de larvas de pez cebra a los QDs, con el fin de identificar y profundizar en los mecanismos biomoleculares implicados en la posible toxicidad inducida por estas NPs. El esquema del procedimiento experimental seguido para implementar la

estrategia super-SILAC se muestra esquematizado en la **Figura 7** y se describe a continuación.

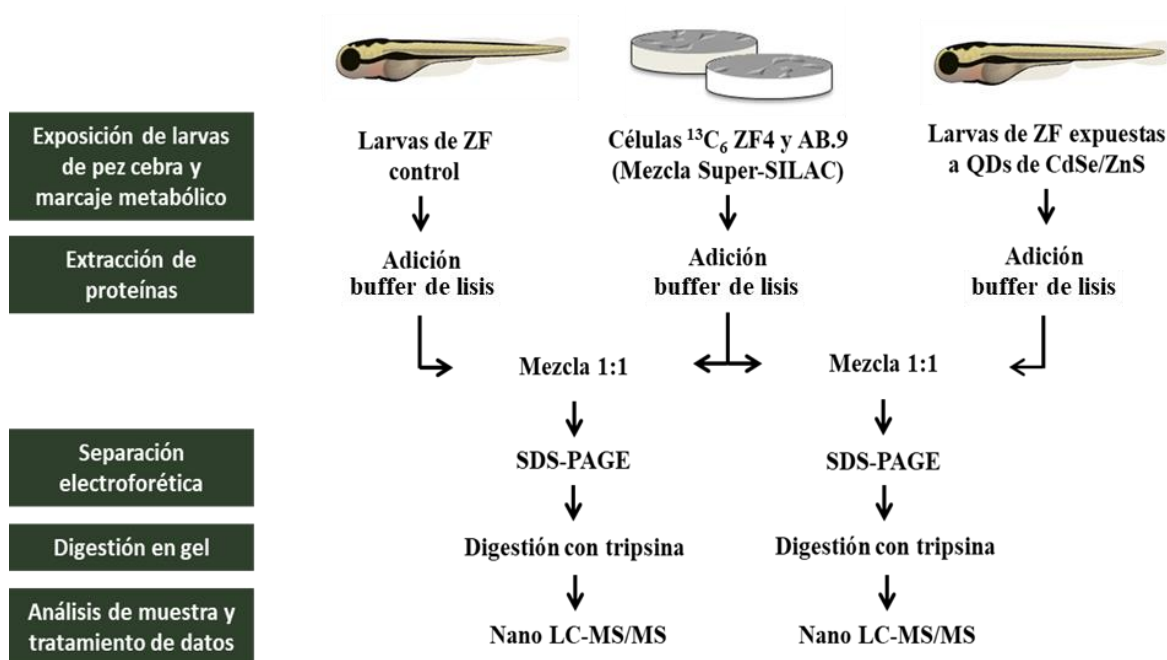


Figura 7. Esquema de las diferentes etapas del procedimiento seguido en la estrategia super-SILAC, empleando como sistema in vivo larvas de pez cebra.

6. b. 1. Exposición de larvas de pez cebra a QDs

Se preparó una disolución de medio larvario de composición similar a la del agua dulce de río (agua ISO): 294 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 123,3 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 63 mg de NaHCO_3 y 5,5 mg de KCl se diluyeron en 1 L de agua destilada. La suspensión de QDs con agua ISO se preparó a una concentración de 2 mg/L en base a la información sobre el LC_{50} para estas QDs, siendo sólo una publicación la que establece un valor máximo de LC_{50} de 4,7 mg/L [92], declarado como cadmio total por unidad de volumen de suspensión de QDs y otros experimentos de estabilidad llevados a cabo por AZTI-Tecnalia (Derio, España). Las larvas de pez cebra de 72 h post fertilización (hpf) se expusieron a los QDs durante 72 h distribuidas homogéneamente mediante agitación constante. De todas las larvas crecidas en disolución, se recolectaron en grupos de 40 como unidad muestral.

6. b. 2. Aislamiento de proteínas de larvas de pez cebra

40 larvas de pez cebra se lisaron y homogeneizaron con un triturador de tejidos manual y 200 μ L de tampón de lisis total. A continuación, se sonicaron con 20 pulsos de 2 s, esperando 5 s entre pulsos. Después de 15 min de incubación a 4 °C, las proteínas se precipitaron con seis volúmenes de acetona (Sigma Aldrich) a 4 °C durante toda la noche a -20 °C. El pellet de proteínas se resuspendió en 60 μ L de agua de calidad masas (Fisher Scientific). Finalmente se cuantificó la cantidad de proteína mediante el método Bradford.

6. b. 3. Marcaje metabólico y lisis celular. Obtención de la mezcla super-SILAC

Las dos líneas celulares seleccionadas para representar al contenido proteico de las larvas de pez cebra y conformar la mezcla super-SILAC fueron la ZF4 y la AB.9 (ATCC). Se seleccionaron estas líneas celulares ya que su contenido proteico es bastante similar al contenido proteico que se encuentra en las larvas de pez cebra. Al igual que en la sección 6.a.1, es muy importante que las células crezcan en el medio pesado durante un mínimo de 6 doblajes, para asegurar un 100% de eficacia de marcaje. La mezcla de las dos líneas celulares se lisó con el tampón de lisis total y se sonicó con 20 pulsos de 2 s y 5 s entre cada pulso, luego se incubó a 4 °C en agitación rotativa. El sobrenadante conteniendo las proteínas se obtuvo después de 10 min de centrifugación a 13.000 rpm y 4 °C. El contenido proteico se cuantificó mediante el método Bradford.

6. b. 4. Identificación y cuantificación de proteínas

Para la identificación y cuantificación de las proteínas diferencialmente expresadas en larvas de pez cebra expuestas a QDs frente a las larvas control, se llevaron a cabo dos experimentos en paralelo en los que las larvas control o las tratadas, se mezclaron de forma independiente y en proporción 1:1 (en proteína total) con la mezcla super-SILAC (*Figura 7*).

Posteriormente, ambas muestras resultantes se mezclaron con el Laemmli sample buffer y se desnaturalizaron con un 4% (v/v) de β -ME previa separación por SDS-PAGE en geles del 10% de entrecruzamiento. Después de la electroforesis, las proteínas se visualizaron mediante tinción con CBB y se digirieron en gel con tripsina, tal como se describió anteriormente en la sección 6.a.3 y 6.a.4. Además, la separación cromatográfica de estos péptidos y su posterior análisis mediante espectrometría de masas también se realizó igual que en la sección 6.a.5.

Los archivos .raw generados se convirtieron a archivos .mgf para utilizarlos con el software MASCOT. Se realizó una búsqueda con una base de datos de *Danio rerio* de NCBIInr que contenía un total de 42.940 secuencias (01/09/2014). Las áreas de pico de los péptidos identificados se obtuvieron utilizando el software Quixot v.1.3.26, al igual que en la sección 6.a.6.

En este caso, para cada uno de los dos experimentos se obtuvo un R_{SILAC} para las diferentes proteínas cuantificadas. El $R_{\text{SILAC}(\text{control})}$ para las larvas control mezcladas con la mezcla super-SILAC (**Ecuación 3**), y el $R_{\text{SILAC}(\text{tratadas})}$ para las proteínas de las larvas expuestas a los QDs (**Ecuación 4**); donde A_{mezcla} representa las áreas de los péptidos pesados procedentes de la mezcla super-SILAC, A_c las áreas de los mismos péptidos pero procedentes de la muestra de larvas control, A_T las áreas de los mismos péptidos pero procedentes de la muestra de larvas expuestas a QDs, y n el número de péptidos cuantificados para la proteína en cuestión.

Dado que las áreas de los péptidos procedentes de la mezcla super-SILAC (A_c) son iguales en ambos R_{SILAC} , se pueden dividir ambos cocientes para obtener el $R_{\text{super-SILAC}}$ (**Ecuación 5**) que permite relacionar directamente la expresión de las proteínas entre las dos muestras de larvas.

$$R_{\text{SILAC}(\text{control})} = \frac{\frac{A_{\text{mezcla } 1}}{A_{C1}} + \frac{A_{\text{mezcla } 2}}{A_{C2}} + \dots + \frac{A_{\text{mezcla } n}}{A_{Cn}}}{n}$$

Ecuación 3

$$R_{\text{SILAC}(\text{tratadas})} = \frac{\frac{A_{\text{mezcla } 1}}{A_{T1}} + \frac{A_{\text{mezcla } 2}}{A_{T2}} + \dots + \frac{A_{\text{mezcla } n}}{A_{Tn}}}{n}$$

Ecuación 4

$$R_{\text{super-SILAC}} = \frac{R_{\text{SILAC}(\text{control})}}{R_{\text{SILAC}(\text{tratadas})}}$$

Ecuación 5

Los procesos funcionales y la localización subcelular de las proteínas identificadas se asignaron en base al conocimiento biológico disponible en las anotaciones de Gene Ontology.

7. Metabolómica no dirigida

Se utilizó la metabolómica no dirigida con el objetivo de identificar metabolitos alterados en células expuestas a MeHg, MeHg-Se(IV) y Surfynol.

El protocolo esquematizado seguido en el proceso, desde la obtención de los metabolitos hasta su análisis mediante GC acoplada a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF) y el tratamiento de datos, se recoge simplificado en la **Figura 8** y se describe detalladamente en los siguientes apartados.

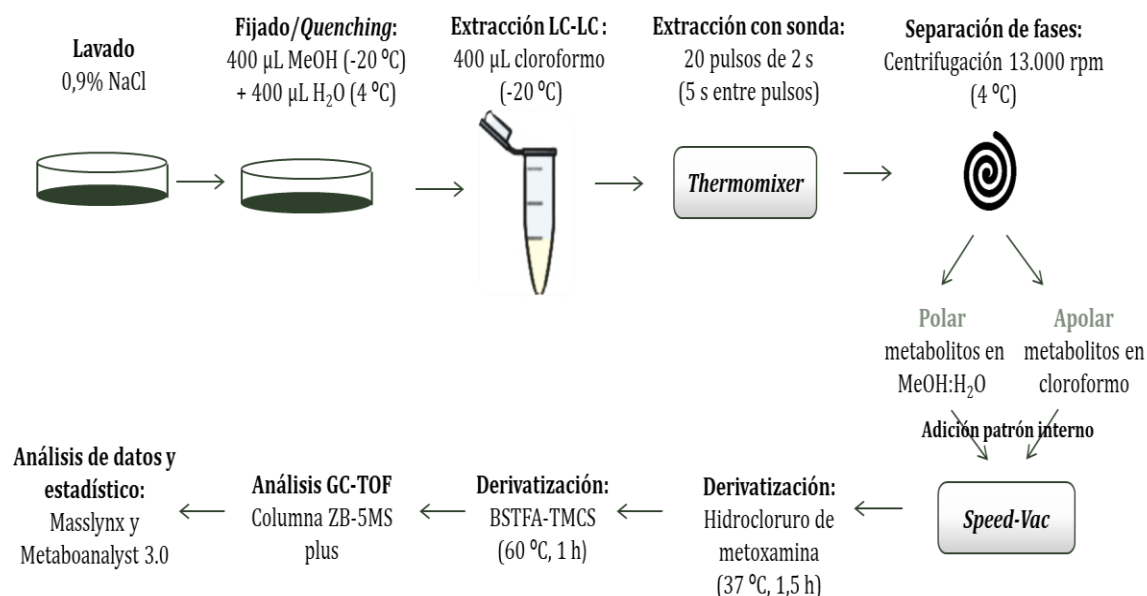


Figura 8. Esquema del procedimiento general de la estrategia de metabolómica no dirigida para la determinación de metabolitos mediante GC-TOF.

7. a Extracción de metabolitos

Se sembraron $1 \cdot 10^6$ células en una placa Petri con 10 mL de medio DMEM con 10% (v/v) de FBS y 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina a 37 °C y con un 5% de CO₂. Tras la exposición al compuesto tóxico correspondiente, las células se lavaron con 1 mL de 0,9% (p/v) de NaCl (Sigma Aldrich) y se fijaron (*quenched*) mediante la adición de 400 µL de metanol (MeOH) calidad LC-MS (Fisher scientific) a -20 °C y 400 µL de agua calidad LC-MS fría (Fisher scientific). Seguidamente, las células se expusieron a los diferentes contaminantes en las siguientes condiciones: células Neuro-2a expuestas a 10 µM de MeHg durante 8 h y la mezcla de 10 µM de MeHg y 10 µM de Se(IV) durante 16 h; células NTERA2 expuestas a 20 mg/L de Surfynol durante 72 h. Tras la exposición, las células se recogieron con un rascador y se transfirieron a un tubo de 1,5 mL. La extracción de los metabolitos se realizó a 4 °C mediante una extracción líquido-líquido que consistió en añadir sobre las células 400 µL de cloroformo (Sigma Aldrich) a -20 °C y sonicar con 20 pulsos de 2 s y 5 s entre pulsos a 4 °C. Tras la centrifugación de las muestras a 13.000 rpm y 4 °C, se separaron la fase superior (polar MeOH-H₂O) de la fase inferior (apolar cloroformo). Finalmente se adicionó a ambas fases 20 mg/L de

ácido 4-fenilbutírico como patrón interno y se evaporaron todas las muestras bajo corriente de nitrógeno a 4 °C.

7. b Derivatización

La derivatización química de los metabolitos se llevó a cabo mediante la adición de 30 µL de hidrocloreto de metoxiamina en piridina (Sigma Aldrich) a una concentración de 40 mg/L y agitación (500 rpm) durante 90 min a 37 °C. Seguidamente, se añadieron 60 µL de una disolución al 1% (v/v) de cloruro de trimetilsililo (TMCS, Sigma Aldrich) en N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA, Sigma Aldrich) para completar la derivatización, manteniéndose la reacción en agitación (500 rpm) durante 1 h a 60 °C. Finalmente, las muestras se filtraron con membranas de politetrafluoroetileno o teflón (PTFE) con un tamaño de poro de 0,22 µm y se introdujeron en viales de vidrio encapsulados con inserto.

7. c Análisis mediante GC-TOF

Se analizaron entre siete y diez réplicas de cada condición mediante GC-MS. Para ello, se utilizó un cromatógrafo de gases (7890A Agilent), acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución con analizador de tiempo de vuelo (GCT premier micromass, Waters). Tras la inyección de 2 µL en modo *Split* a una temperatura de 270 °C, los metabolitos se separaron en una columna ZB-5MS plus (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm, Phenomenex), utilizando He como gas portador a un flujo de 1 mL/min. El programa de temperaturas del horno comenzó a 60 °C durante 3 min y se realizó una rampa de temperaturas lineal a 6 °C/min hasta alcanzar los 325 °C, temperatura que se mantuvo durante 3 min. Se empleó la técnica de ionización por impacto electrónico y el analizador trabajó en modo *scan* fijando el rango de masas entre 50 y 800 m/z. La detección de los iones se realizó con una placa de microcanal (MCP, Waters). Cada cuatro muestras, se inyectó un patrón para columnas de GC (Phenomenex) como control de calidad del correcto funcionamiento del equipo.

7. d Análisis de datos y estudios estadísticos

El análisis de los datos obtenidos de los experimentos de metabolómica no dirigida se realizó utilizando el software MassLynx (Waters). Para cada muestra, el área de pico de cada metabolito se normalizó con el área de patrón interno correspondiente. Los metabolitos se identificaron en base a espectros de masas y a la exactitud de la masa mediante el uso de la biblioteca de búsqueda 2.0 del Instituto nacional de estándares y tecnología (NIST).

Se utilizó la prueba t de Student de dos colas, con un nivel de confianza del 95%, para comparar las áreas de pico de metabolitos de ambas condiciones experimentales (el valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo). Se denominó RM al cociente del área normalizada del metabolito proveniente de células expuestas al compuesto potencialmente tóxico, entre del área normalizada del metabolito proveniente de células control. Los datos también se exploraron y modelaron por el Análisis de Componentes Principales (PCA), utilizando la herramienta informática metaboanalyst 3.0. Los datos experimentales se sometieron al estudio de PCA tras ser centrados en la media y escalar la varianza a la unidad [152]. Se utilizaron los metabolitos estadísticamente diferentes, con valores de $p < 0,05$, para crear una red mediante el software STITCH versión 4 con los siguientes parámetros establecidos: una confianza media de la interacción de los metabolitos (0,40) y permitiendo la presencia de alguna proteína como nexo entre metabolitos con una fiabilidad superior a 0,99. La red creada se trazó usando el software Cytoscape 3.7.0 [153].

8. Metabolómica dirigida

La metabolómica dirigida se empleó para la cuantificación de metabolitos concretos, relevantes para entender los mecanismos de toxicidad asociados a los diferentes compuestos, que no habían sido identificados mediante metabolómica no dirigida como son: el adenosín trifosfato (ATP), adenosín difosfato (ADP), dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH) y el dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado (NAD⁺).

El protocolo seguido, que incluye desde el proceso de extracción de los cuatro metabolitos hasta su análisis mediante LC-ESI-QQQ y el tratamiento de datos, se recoge resumido en la **Figura 9**.

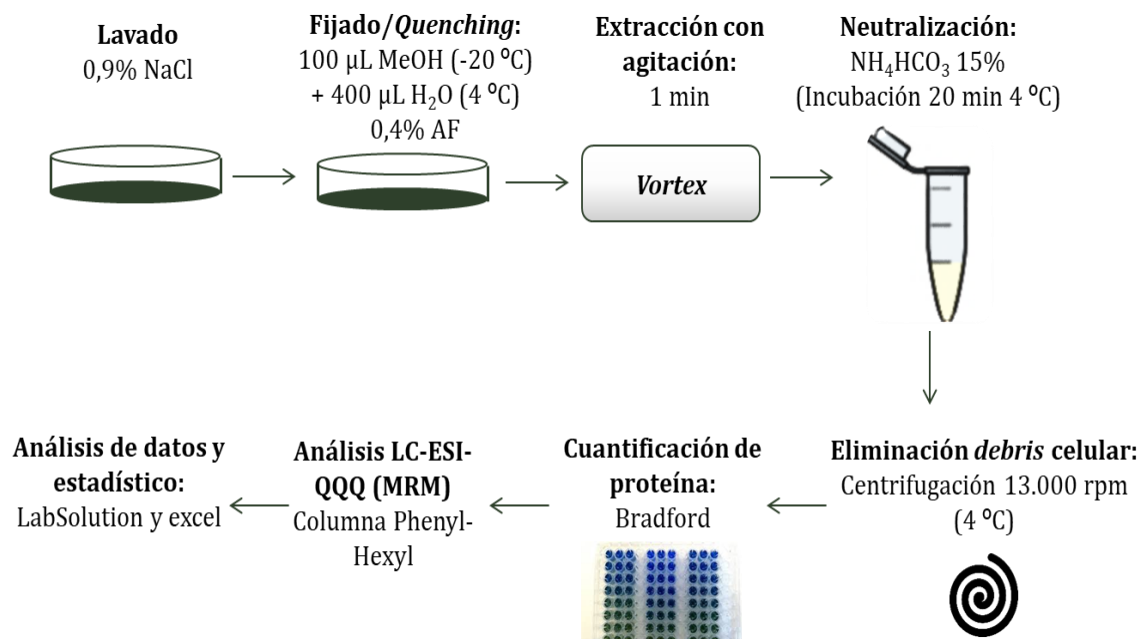


Figura 9. Esquema del procedimiento general de la estrategia de metabolómica dirigida para la determinación de ATP, ADP, NADH, NAD⁺ mediante LC-ESI-QQQ.

8. a Extracción de ATP, ADP, NADH, NAD⁺

Las células se sembraron en las mismas condiciones descritas para los experimentos de metabolómica no dirigida. Puesto que este ensayo se realizó para complementar dichos estudios, las condiciones de exposición para el MeHg, MeHg-Se(IV) y Surfynol fueron las mismas que las descritas en el apartado 7. a. Tras el tiempo de exposición a los compuestos potencialmente tóxicos, las células se lavaron con 0,9% (p/v) de NaCl. El protocolo de extracción se basó en el procedimiento optimizado por Lu *et al.*, 2017 [154]. En primer lugar, se adicionaron 100 µL de MeOH a -20 °C y tras recoger las células con un rascador, se añadieron 400 µL de agua fría conteniendo 0,4% (v/v) de AF y se agitaron con vortex durante 1 min. Después de incubar 3 min a 4 °C, se utilizaron 45 µL de NH₄HCO₃ al 15% (p/v) para neutralizar las muestras. La

neutralización se llevó a cabo a 4 °C durante 20 min. Antes de analizar las muestras, éstas se centrifugaron a 13.000 rpm y 4 °C durante 10 min y se filtraron a través de membranas de PTFE con un tamaño de poro de 0,22 µm. Paralelamente al análisis, se realizó un ensayo Bradford con el fin de normalizar la concentración de metabolitos en relación a la concentración de proteína total de cada muestra.

8. b Análisis mediante LC-ESI-QQQ-MS

Con objeto de cuantificar los cuatro metabolitos de interés, se empleó la técnica de monitoreo de reacción múltiple (MRM). Se analizaron entre cinco y siete réplicas, de cada condición, en un instrumento LCMS-8030 equipado con un analizador de triple cuadrupolo (QQQ) y una fuente de iones ESI operando en modo negativo. Se empleó N₂ como gas de nebulización (1,5 L/min) y de secado (15 L/min), mientras que como gas de colisión se utilizó Ar (17 kPa). El voltaje del capilar ESI se fijó en 4,5 kV y la temperatura de la línea de desolvatación (DL) a 250 °C. Las transiciones MRM para cada compuesto se seleccionaron en base al fragmento de mayor peso molecular e intensidad. La cuantificación de los analitos se realizó con el área de la transición cuantificadora de cada compuesto: ATP 506,00 > 426,00; ADP 426,00 > 158,75; NADH 664,10 > 78,95; NAD⁺ 662,10 > 540,00.

La separación mediante cromatografía de líquidos se llevó a cabo en una columna poroshell 120 Phenyl-Hexyl (2,1 mm x 50 mm, 2,7 µm, Agilent). La fase móvil A consistió en una mezcla 97/3 H₂O/MeOH con 10 mM tributilamina y 3 mM ácido acético, mientras que la fase móvil B fue exclusivamente MeOH. El gradiente binario que se utilizó para realizar la separación se recoge en la **Tabla 3**. El volumen de muestra empleado fue de 20 µL y la separación cromatográfica se realizó a un flujo de 0,3 mL/min.

Tabla 3. Gradiente empleado para la separación de ATP, ADP, NADH y NAD⁺ mediante LC.

Tiempo (min)	Fase Móvil A (%)	Fase Móvil B (%)
1	100	0
2	55	45
7	50	50
8	5	95
9	5	95
10	100	0
11	Final	

8. c Análisis de datos y estudios estadísticos

El análisis de los datos de metabolómica dirigida se realizó con el software Lab Solution 5.72 (Schimazdu). Las diferencias encontradas en el contenido de ATP, ADP, NADH y NAD⁺ en función de las condiciones de exposición, se confirmaron mediante el estudio estadístico ANOVA y posterior test de Bonferroni con un nivel de confianza superior al 95% (los valores de $p < 0,05$, $p < 0,005$ y $p < 0,001$ se consideraron estadísticamente significativos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se describen los principales resultados y las conclusiones obtenidas de los estudios bioanalíticos, de proteómica cuantitativa y metabolómica realizados para evaluar la toxicidad de los QDs, el MeHg y el Surfynol.

I. ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE LOS QDs DE CdSe/ZnS

I. 1 Resultados

El uso extensivo de los QDs de CdSe/ZnS, tanto en dispositivos tecnológicos como en aplicaciones biomédicas, es el principal motivo por el cual el estudio de la toxicidad de estas NPs se propuso como principal objetivo de este capítulo. A priori, cualquier tipo de NPs que contenga elementos metálicos podrían ser tóxicas; en el caso de los QDs de CdSe/ZnS, esta preocupación aumenta debido a la presencia de Cd en el núcleo de los mismos. El Cd es conocido por su alta toxicidad relacionada con la capacidad de romper las hebras de ADN, de inhibir las síntesis de biomoléculas, e incluso de inducir disfunciones de orgánulos mediante su conjugación a grupos sulfidrilos de proteínas [155].

I. 1. a Estudio de viabilidad celular

En primer lugar, con objeto de evaluar el potencial efecto citotóxico de estos QDs, se estudió la viabilidad de las células HepG2, Neuro-2a, Raw, HaCaT, Hek293 y Hos tras su exposición a diferentes concentraciones de QDs durante 72 h. Los resultados obtenidos para cada condición ($n = 5$) se recogen en la **Figura 10**. Se observó el decrecimiento de la viabilidad celular a medida que aumentó la concentración de los QDs de CdSe/ZnS. Como se puede apreciar en la **Figura 10**, determinadas líneas celulares se vieron más afectadas que otras tras la exposición. Así, mientras que en las líneas HepG2, Hek293 y Hos la viabilidad celular no bajó del 70% incluso a la concentración de NPs más elevada (100 mg/L), la línea celular Raw experimentó un descenso de la viabilidad mucho más acusado, llegando hasta un 36% a la concentración más alta. Este decrecimiento tan notable de la viabilidad, puede deberse a una mayor internalización de estas NPs en esta línea celular ya que, la función biológica de los macrófagos consiste en fagocitar cualquier cuerpo extraño que se introduce en el organismo. A pesar de las diferencias observadas en cuanto a los valores de viabilidad para las diferentes líneas celulares, los resultados mostraron una citotoxicidad significativa y que, por tanto, debe ser estudiada en mayor profundidad. Con objeto de evaluar el mecanismo de toxicidad de estos QDs se escogió la línea celular

HepG2 ya que, según bibliografía, los QDs tienden a acumularse preferentemente en el hígado [77,155].

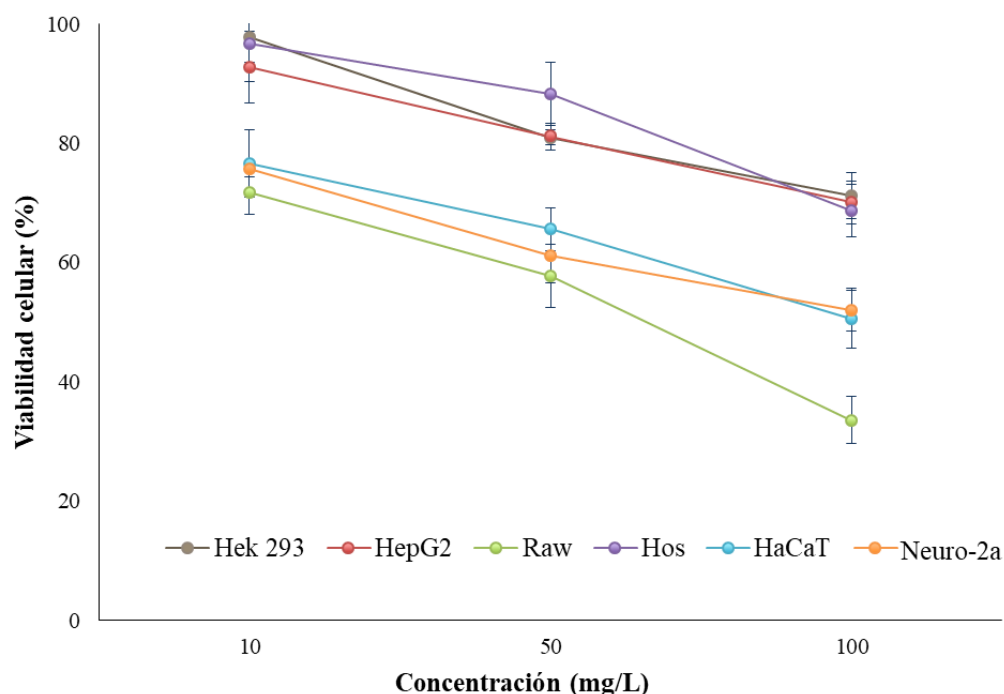


Figura 10. Viabilidad celular para diferentes líneas celulares expuestas a diferentes concentraciones de QDs de CdSe/ZnS durante 72 h. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT ($n = 5$).

Además, se realizó un estudio de viabilidad celular a diferentes tiempos de exposición (24, 48 y 72 h), utilizando la concentración intermedia (50 mg/L) y las células HepG2 seleccionadas. Este estudio demostró la disminución de la viabilidad celular con el paso del tiempo. Siendo la viabilidad del $86 \pm 2\%$ transcurridas 24 horas y llegando al $74 \pm 3\%$ a las 72 horas. En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron como condiciones de exposición óptimas para futuros estudios 50 mg/L y 72 h, al tratarse de condiciones a las cuales existe un daño, pero permanecen viables un número suficiente de células, permitiendo así evaluar los mecanismos de toxicidad sin que el modelo esté altamente comprometido.

Por otro lado, y con el objetivo de comparar el efecto de los QDs con el inducido por los metales Cd y Se en su forma iónica, se determinó la viabilidad celular de la línea HepG2 expuesta a 50 mg/L de los QDs de CdSe/ZnS y a concentraciones equimolares de los iones que forman parte del núcleo de estas nanopartículas [151]. Este estudio de viabilidad reveló (**Figura 11**) que, a concentraciones equimolares, el Cd^{2+} libre resulta letal para las células y el Se^{2-} disminuye la viabilidad por debajo del 50%. Estos resultados ponen de manifiesto que, en el caso de los QDs, y durante el tiempo de exposición empleado, el núcleo de la nanopartícula no experimenta procesos de oxidación-reducción o, al menos, no mayoritariamente. Este hecho, también demostrado en estudios anteriores [156,157], sugiere que los QDs ejercen su toxicidad a través de un mecanismo molecular propio y probablemente diferente al mecanismo activado tras la exposición a los mismos metales en su forma iónica.

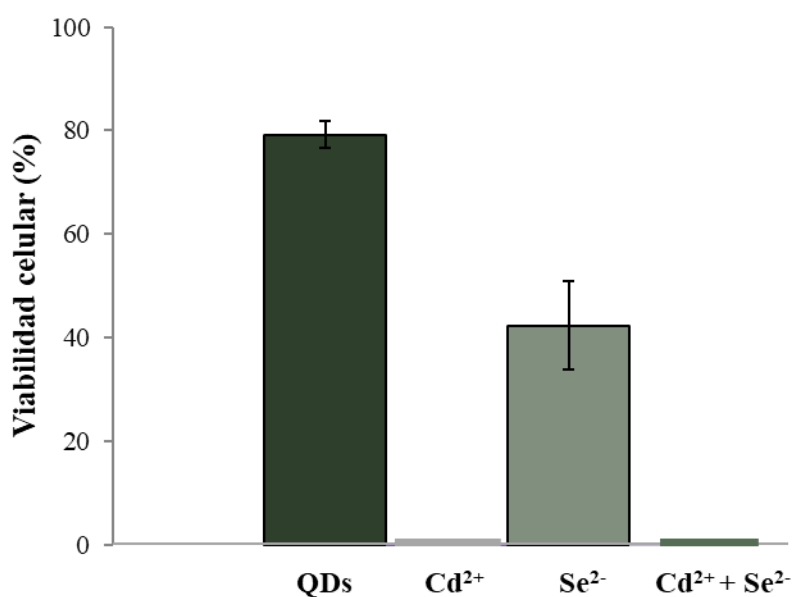


Figura 11. Viabilidad de células HepG2 expuestas a 50 mg/L de QDs de CdSe/ZnS y concentraciones equimolares de los iones que componen su núcleo (Cd^{2+} y Se^{2-}). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT ($n = 5$).

I. 1. b Estudio de internalización celular y localización en orgánulos

Mediante este ensayo se evaluó la cinética de internalización de los QDs en el modelo celular anteriormente mencionado. Las imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases y epifluorescencia, pusieron de manifiesto que 12 h de exposición son suficientes para observar una internalización parcial de los QDs (**Figura 12**) en células HepG2. En las imágenes aparecen los QDs como puntos rojos, en verde se observan los filamentos de actina que componen el citoesqueleto celular, y en azul se marca el núcleo.

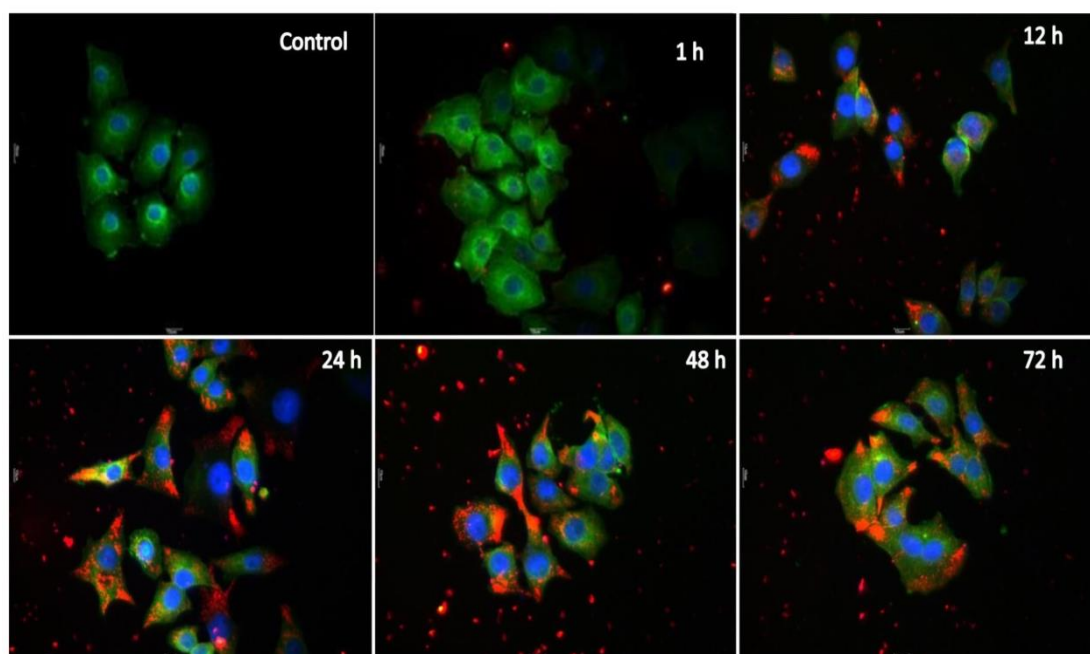


Figura 12. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HepG2 expuestas a 50 mg/L de QDs de CdSe/ZnS durante 0, 1, 12, 24, 48 y 72 h. Se muestra la superposición de tres imágenes correspondientes a los 3 canales adquiridos a diferentes longitudes de onda de emisión: faloidina como marcaje del citoesqueleto (verde), DAPI como marcaje nuclear (azul) y QDs (rojo).

Estas imágenes demuestran que la internalización de los QDs se realiza de manera gradual, apreciándose un mayor número de ellas en el interior celular transcurridas 48-72 h. También se puede concluir que la localización intracelular de los QDs de

CdSe/ZnS se reduce al citoplasma, a pesar de que, por su pequeño tamaño, a priori, tendrían capacidad para penetrar la membrana nuclear. No obstante, no se observa su presencia en el núcleo en ninguna de las imágenes obtenidas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo de viabilidad celular, ya que la mayor internalización observada con el tiempo, corresponde a un mayor descenso de la viabilidad celular a mayores tiempos de exposición. Por otro lado, el hecho de que los QDs mantengan intacta su emisión de fluorescencia, pone de manifiesto que son estables y que no forman agregados en el interior celular a los tiempos estudiados, ya que de lo contrario la emisión de fluorescencia cambiaría o no se produciría.

Posteriormente, se empleó la microscopía de transmisión electrónica con objeto de obtener mayor resolución en cuanto a la localización celular de los QDs, y la espectroscopía de energía dispersiva de rayos X para confirmar la existencia de estas NPs a partir de los espectros obtenidos. Mediante TEM, se observó la presencia de gran parte de QDs en vacuolas localizadas en el citoplasma celular (*Figuras 13.A1 y 13.A2*), que se confirma por la aparición de Cd en el espectro EDS (*Figura 13.B1*), ya que no hay otra fuente de Cd posible, ni biológicamente en la célula, ni en el procesamiento de las muestras, que no sea debida a la propia composición de los QDs. De hecho, como puede apreciarse en los controles (*Figuras 13.A3 y 13.B2*) no se observan ni los QDs ni Cd en el espectro de EDS. Asimismo, los QDs también se localizaron en la membrana externa de mitocondrias (*Figuras 13.C1 y 13.C2*) que, además, aparecieron dañadas estructuralmente. Al comparar a mayor aumento la morfología de una mitocondria presente en una célula expuesta a los QDs (*Figura 13.C2*) con una mitocondria presente en células control (*Figura 13.C3*), se observa que en la primera, sólo quedan restos de las crestas mitocondriales, esenciales para compartimentalizar la matriz mitocondrial y, por tanto, para desempeñar correctamente su función. La presencia de los QDs en las mitocondrias se confirmó igualmente mediante EDS (*Figuras 13.D1 y 13.D2*). Por otro lado, y a pesar de su pequeño tamaño (6 nm), los QDs no se encontraron en el núcleo celular (imagen no mostrada) ni tampoco restos de Cd, lo que confirma los resultados obtenidos por microscopía de epifluorescencia (*Figura 12*).

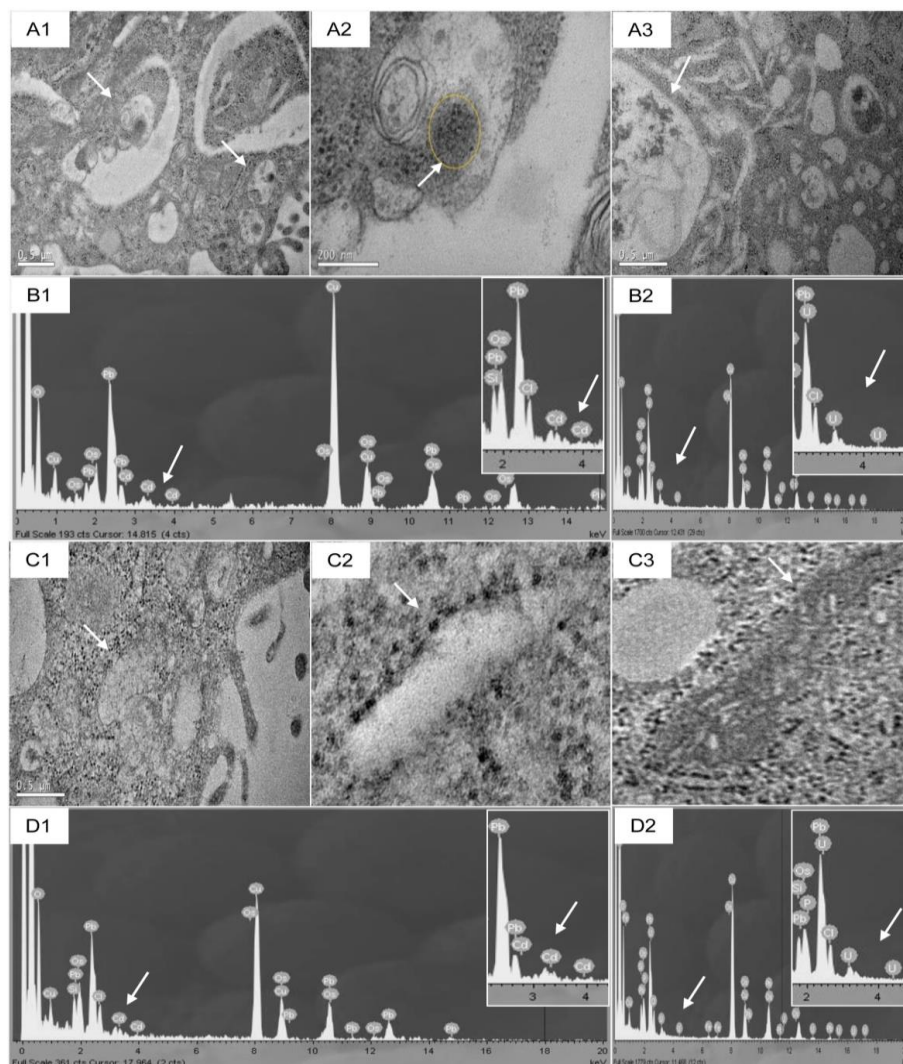


Figura 13. Localización intracelular de los QDs en células HepG2 tras 72 h de exposición evaluada mediante TEM y EDS. A, micrografías de vacuolas de células expuestas a QDs (A1 y A2) y de células control (A3); B, espectros de EDS realizados sobre vacuolas de células expuestas a QDs (B1) y células control (B2); C, micrografías de mitocondrias de células expuestas a QDs (C1 y C2) y de células control (C3); D, espectros de EDS realizados sobre mitocondrias de células expuestas a QDs (D1) y células control (D2).

I. 1. c Perfil del ciclo celular

Para evaluar el perfil de ciclo celular en células HepG2 expuestas a QDs, se empleó la citometría de flujo con marcaje Hoescht, y el software ModFit que, sobre el histograma (**Figura 14**), presupone que en la fase G2/M, el contenido de ADN es el doble que en la fase G0/G1. Esto permite obtener el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las fases del ciclo celular: G0/G1, S y G2/M. Las células que dan menos señal de fluorocromo (M1) coinciden generalmente con células apoptóticas que ya tienen rotas las cadenas de ADN y, por tanto, incorporan menor cantidad del fluorocromo. Se le llama pico hipodiploide (si las células que estamos analizando son diploides). Las siguientes son las células que se encuentran en las fases G0/G1 (M2), fase de crecimiento de la célula. Las células que aparecen a continuación, se encuentran en fase de síntesis S (M3), que es la fase de replicación del material genético, por lo que contienen una cantidad de ADN variable entre las fases G0/1 y las fases G2/M. Finalmente, las células que proporcionan una mayor señal son las que están en las fases G2/M (M4), donde la cantidad de material genético se ha duplicado, ya que es la fase de preparación para la división y la entrada en mitosis.

En la **Figura 15** se representan los porcentajes de población celular, presentes en cada una de las fases del ciclo celular, para las diferentes condiciones de exposición evaluadas. Se observa que ninguna de las concentraciones de QDs llevadas a estudio induce un cambio significativo en el perfil del ciclo celular. Se puede concluir, por tanto, que los QDs de CdSe/ZnS no inducen arresto de ciclo celular en ninguna de sus fases en células HepG2, en el rango de concentración de 10-100 mg/L tras un periodo de exposición de 72 h.

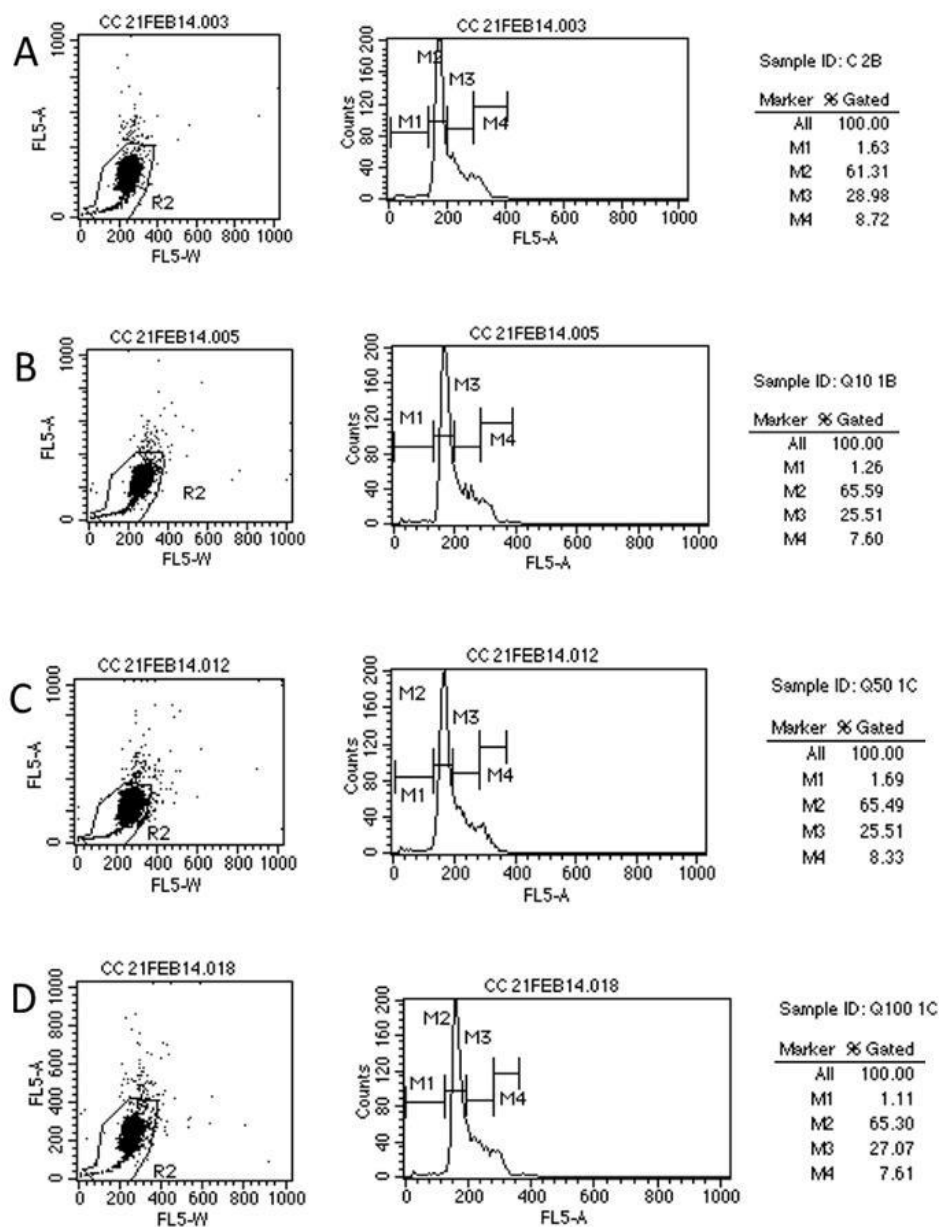


Figura 14. Histogramas, representación bidimensional y tablas de porcentajes de las diferentes poblaciones celulares para cada una de las condiciones evaluadas: A, control; B, 10 mg/L de QDs; C, 50 mg/L de QDs; D, 100 mg/L de QDs. En todos los casos se emplearon células HepG2 y el tiempo de exposición a los QDs fue de 72 h.

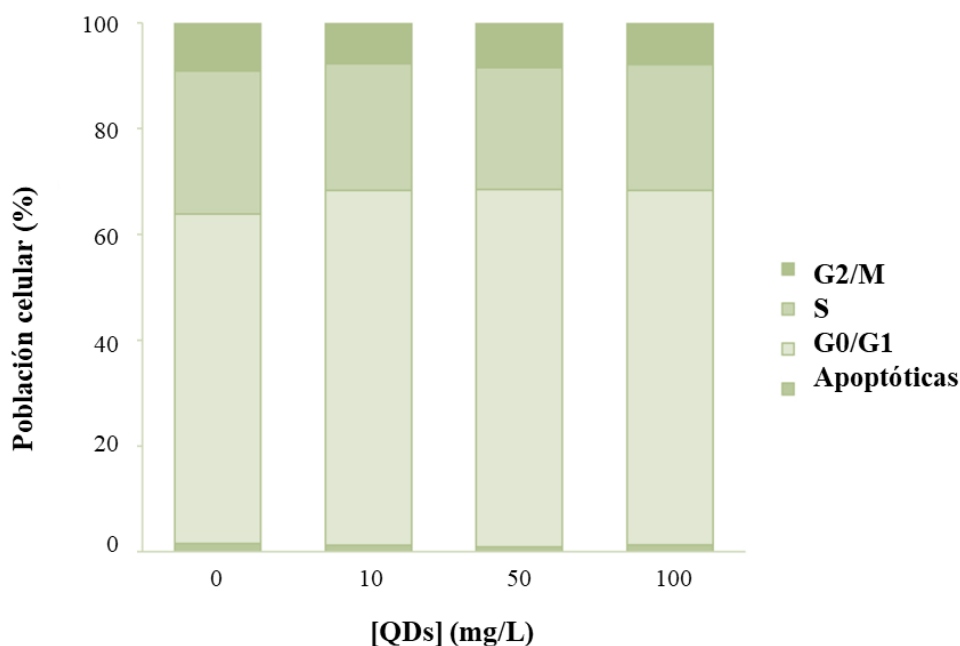


Figura 15. Porcentaje de población celular en cada una de las fases del ciclo celular para cada una de las concentraciones de exposición a QDs evaluadas. Ninguna de las condiciones fue significativamente diferente a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$) ($n = 5$).

I. 1. d Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en células HepG2 expuestas a QDs de CdSe/ZnS

La identificación de proteínas diferencialmente expresadas tras la exposición de células HepG2 a 50 mg/L de QDs durante 72 h, se llevó a cabo mediante la estrategia de proteómica cuantitativa SILAC. El experimento se realizó por duplicado y se identificaron un total de 1168 proteínas en el ensayo de SILAC directo, y 1165 en el inverso. Las identificaciones se llevaron a cabo con un nivel de confianza del 99% ($p < 0,01$). Se estableció como criterio que todas las proteínas consideradas válidas se hubieran identificado con al menos dos péptidos únicos, es decir, dos péptidos que no se compartieran por ninguna otra proteína. De las proteínas identificadas, 460 pasaron los criterios de cuantificación, que se establecieron en un Mascot score superior a 46 para cada proteína identificada ($p < 0,01$), y de 39 para los péptidos que las conforman ($p < 0,05$). Además, estas proteínas debían haber sido identificadas en las dos réplicas y poseer una desviación estándar relativa asociada al valor de cuantificación R_{SILAC}

inferior al 20%. Se consideraron desreguladas, proteínas que mostraron un R_{SILAC} superior a 1,30 o inferior a -1,30. Con este criterio, de las 460 proteínas cuantificadas se encontraron alteradas un total de 54 proteínas, de las cuales 32 se encontraron sobreexpresadas y 22 inhibidas. Como cabía esperar en un experimento de este tipo, la mayoría de las proteínas cuantificadas mostraron un R_{SILAC} cercano a 1, lo que indica que la mayor parte de proteínas no se ven alteradas tras la exposición a QDs en las condiciones evaluadas (**Figura 16**).

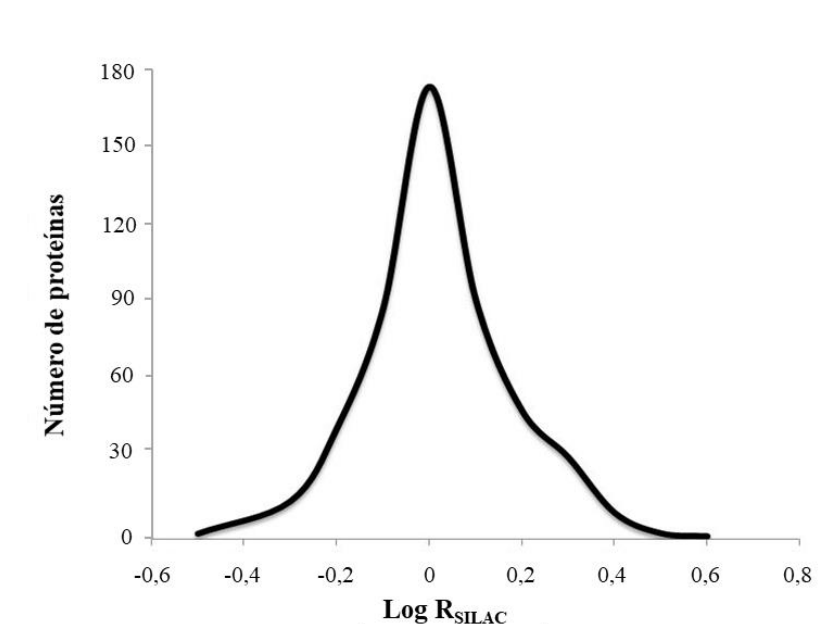


Figura 16. Distribución de los cocientes SILAC (R_{SILAC}) para las proteínas identificadas.

La lista de proteínas diferencialmente expresadas en células HepG2 tras la exposición a los QDs de CdSe/ZnS, se recoge en la **Tabla 4**, donde se incluye el número de identificación GI, el R_{SILAC} para cada proteína, el Mascot score y la desviación estándar relativa (%RSD).

Tabla 4. Proteínas expresadas diferencialmente en células HepG2 expuestas a 50 mg/L de QDs de CdSe/ZnS durante 72 h.

Número GI	Nombre de la proteína	R _{SILAC}	Mascot score	SILAC RSD (%)
4504169	glutathione synthetase	-1,72	103	2,73
188497758	ubiquitin-associated protein 2-like isoform a	-1,50	118	11,39
4506467	radixin isoform 2	-1,48	111	20,29
15718687	40S ribosomal protein S3 isoform 1	-1,47	131	19,54
4506623	60S ribosomal protein L27	-1,47	50	12,78
4507521	transketolase isoform 1	-1,46	65	3,27
4502643	T-complex protein 1 subunit zeta isoform a	-1,45	105	10,69
22202633	prefoldin subunit 5 isoform alpha	-1,44	122	3,23
4885417	ubiquitin-conjugating enzyme E2 K isoform 1	-1,44	158	3,42
116812577	putative RNA-binding protein Luc7-like 2 isoform 1	-1,43	98	16,81
4885377	histone H1.3	-1,42	228	17,01
4503521	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	-1,40	98	0,82
4826659	F-actin-capping protein subunit beta isoform 1	-1,39	130	19,88
23110944	proteasome subunit alpha type-6	-1,38	220	13,47
5803137	putative RNA-binding protein 3	-1,38	110	17,69
7706753	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5 isoform 1	-1,37	93	3,60
4506901	serine/arginine-rich splicing factor 3	-1,36	66	9,44
22538467	proteasome subunit beta type-4	-1,33	216	19,42
17158044	40S ribosomal protein S6	-1,33	114	19,68
4501887	actin. cytoplasmic 2	-1,33	341	1,22
5174735	tubulin beta-4B chain	-1,32	1365	14,12
166235148	osteoclast-stimulating factor 1	-1,30	82	11,40
4506005	serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit isoform 1	1,30	128	17,94
4826760	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	1,30	187	13,64
4506685	40S ribosomal protein S13	1,31	194	9,88
4758504	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 isoform 1	1,31	111	10,73
20127499	serine/arginine-rich splicing factor 6	1,31	69	16,02
10800144	histone cluster 1. H2aj	1,31	293	18,33
38373690	COP9 signalosome complex subunit 4 isoform 1	1,32	101	15,91
30581141	proteasome activator complex subunit 1 isoform 2	1,32	195	18,06
190358517	ras-related protein Rab-11B	1,34	344	18,9
12408675	prefoldin subunit 2	1,35	146	13,57
33286418	pyruvate kinase isozymes M1/M2 isoform a	1,35	74	19,25

Número GI	Nombre de la proteína	R _{SILAC}	Mascot score	SILAC RSD (%)
154759259	spectrin alpha chain. non-erythrocytic 1 isoform 2	1,35	160	13,38
148727341	serine-threonine kinase receptor-associated protein	1,36	59	14,86
4501867	aconitate hydratase. mitochondrial precursor	1,36	188	17,20
4758304	protein disulfide-isomerase A4 precursor	1,37	55	12,52
157502193	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 isoform 1	1,37	93	9,81
8923857	ER membrane protein complex subunit 3	1,37	65	0,81
5032007	transcriptional activator protein Pur-alpha	1,37	96	16,18
30581135	structural maintenance of chromosomes protein 1A	1,37	123	10,95
23510381	transportin-1 isoform 2	1,41	121	11,71
14110414	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 isoform c	1,41	229	19,64
296317337	voltage-dependent anion-selective channel protein 2 isoform 1	1,43	105	0,49
20149560	syntaxin-4	1,44	88	5,01
6678271	TAR DNA-binding protein 43	1,45	167	15,77
284795266	signal recognition particle receptor subunit beta	1,46	59	19,36
4759224	programmed cell death protein5	1,48	170	19,01
4501891	alpha-actinin-1 isoform b	1,49	295	13,66
5902076	serine/arginine-rich splicing factor 1 isoform 1	1,50	152	18,88
112382250	spectrin beta chain. non-erythrocytic 1 isoform 1	1,52	175	2,38
4507791	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	1,55	70	17,62
114155144	tropomyosin alpha-3 chain isoform 4	1,62	182	14,04
16306548	serine--tRNA ligase. cytoplasmic	1,72	214	17,86

Las proteínas diferencialmente expresadas, se agruparon en función de los procesos biológicos en los que intervienen empleando la base de datos Gene Ontology (**Figura 17**). Se puede concluir que la exposición a QDs de CdSe/ZnS afecta principalmente a proteínas implicadas en el metabolismo de otras proteínas y del ácido ribonucleico (ARN), a la reparación del ADN, a los mecanismos de defensa celulares y a la estructura y morfología celular. Una discusión más extensa de estos resultados se ha llevado a cabo en una sección posterior y de forma conjunta a las alteraciones encontradas en el modelo de larvas de pez cebra que se comenta a continuación.

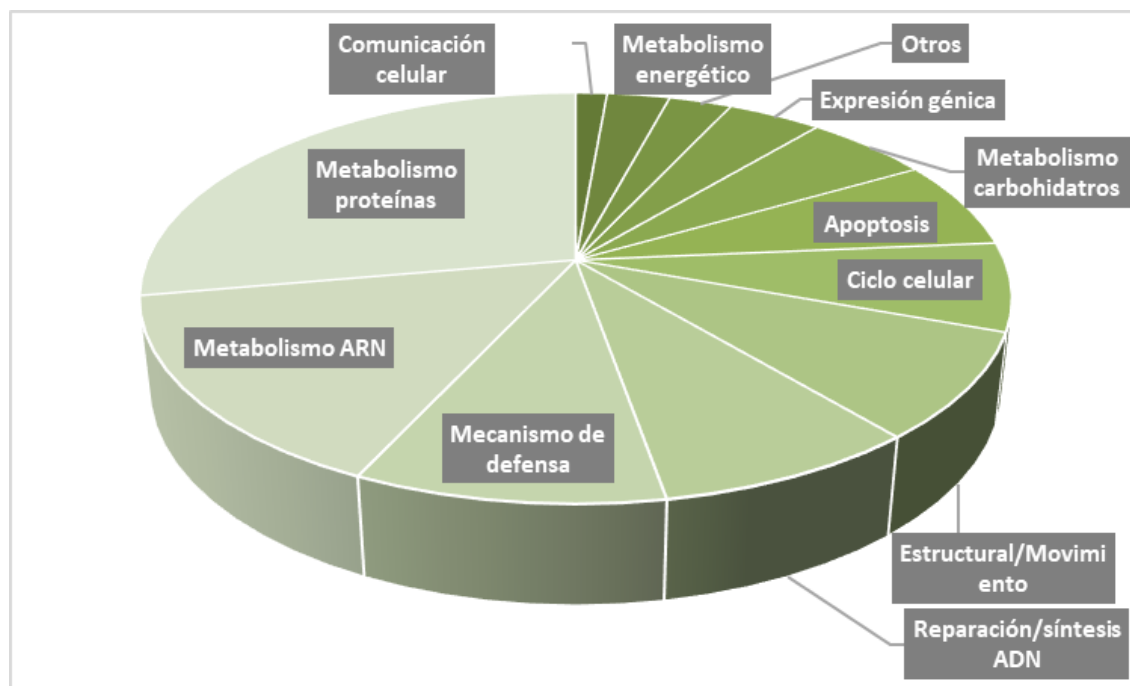


Figura 17. Principales procesos biológicos en los que están implicadas las proteínas alteradas por efecto de los QDs en células HepG2. La información se ha obtenido de la base de datos GO.

I. 1. e Optimización del método de extracción de proteínas de larvas de pez cebra

El pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en las últimas décadas en un excelente modelo para estudios farmacológicos, eco-toxicológicos y de enfermedades tales como las neurodegenerativas o el cáncer [158–161]. La gran aplicabilidad de esta especie, procedente del sudeste asiático, se debe a los siguientes aspectos [159,160,162,163]:

- Su pequeño tamaño. Los embriones de este pez tienen un diámetro inferior a 1 mm, por lo que pueden mantenerse en 100 μ L de medio durante días.
- Su excelente fertilidad y su cría sencilla y económica. Una pareja de esta especie produce entre 100 y 300 embriones semanalmente. Además, el desarrollo de

las larvas es muy rápido, en 48 hpf desarrolla la mayoría de los órganos principales, incluyendo el intestino y el sistema cardiovascular; y a las 72 hpf completa su desarrollo embrionario.

- Tanto las larvas como los adultos más jóvenes son transparentes, lo que permite observar cambios estructurales al microscopio.
- La administración del compuesto tóxico de interés puede llevarse a cabo de forma simple, precisa y homogénea a través del medio acuoso en el que viven, ya que las larvas son permeables a pequeñas moléculas o fármacos.
- El genoma del pez cebra está secuenciado, lo que facilita la realización de estudios de genómica o proteómica.
- La gran similitud génica con los mamíferos. Esto nos permite entender procesos específicos de animales vertebrados, a diferencia de cultivos celulares u otros modelos *in vivo* como moscas o gusanos.

Para llevar a cabo los estudios de proteómica cuantitativa basados en la estrategia super-SILAC, empleando larvas del pez cebra con modelo *in vivo*, y dado que es la primera vez que esta estrategia proteómica se lleva a cabo empleando este modelo; fue necesario, en primer lugar, la optimización de un método de extracción de proteínas que permitiera la obtención del mayor número posible de ellas sin inducir su posible degradación. El esquema general del proceso de extracción de proteínas de larvas de pez cebra con sus distintas etapas y las diferentes condiciones evaluadas se recoge en la **Figura 18**. En todas las pruebas realizadas se emplearon 20 larvas de pez cebra como unidad muestral.

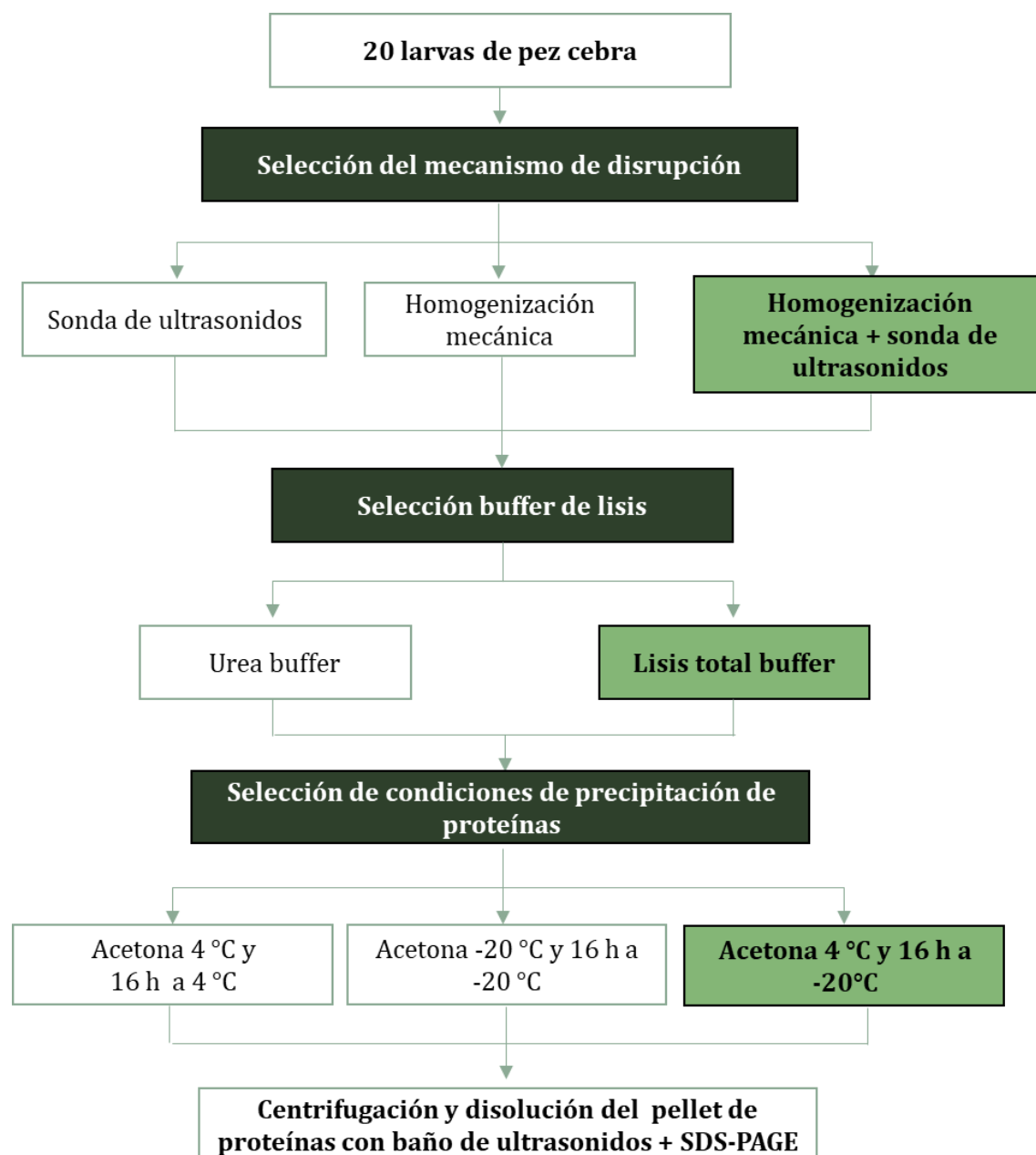


Figura 18. Esquema general de las diferentes etapas optimizadas y las condiciones evaluadas y seleccionadas como óptimas (en verde claro) para la extracción de proteínas de larvas de pez cebra.

La primera etapa en optimizarse fue el mecanismo de disrupción de los tejidos, empleando las condiciones utilizadas por Cuello *et al.*, 2012 [164]. Para ello, se probó una disrupción mecánica, una disrupción mediante microsonda de ultrasonidos empleando 20 pulsos de 2 s, y esperando 5 s entre pulsos para evitar el sobrecalentamiento de la muestra, y una combinación de ambas. Como se observa en la **Figura 19.A**, la cantidad de proteínas extraídas empleando la combinación de disrupción mecánica y microsonda de ultrasonidos fue muy superior en comparación con las proteínas extraídas mediante los dos métodos por separado. Por ello, se seleccionó dicha combinación como óptima.

Posteriormente, se optimizó la composición del buffer de lisis. Se evaluó un buffer de lisis total (20 mM tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 50 mM NaF, 10 mM EDTA, 0,5 M NaCl, 1% (v/v) Tritón x100 e inhibidores de proteasas) y un buffer de urea (8 M urea, 50 mM ditiotretitol, 4% (p/v) CHAPs, 1% (v/v) Tritón x100 e inhibidores de proteasas). En este caso, el buffer de lisis total proporcionó una mayor cantidad de proteína total extraída, por lo que se seleccionó para los experimentos posteriores (**Figura 19.B**).

Por último, se optimizó el método de precipitación de proteínas utilizando en todos los casos seis volúmenes de acetona y evaluando el efecto de la temperatura tanto de adición como de incubación a 4 o -20 °C. En todos los casos, el tiempo de incubación fue de 16 h. Tal y como se observa en la **Figura 19.C**, se puede concluir que la adición de acetona a 4 °C y una posterior incubación a -20 °C, resultaron ser las condiciones más adecuadas para maximizar el número de proteínas precipitadas.

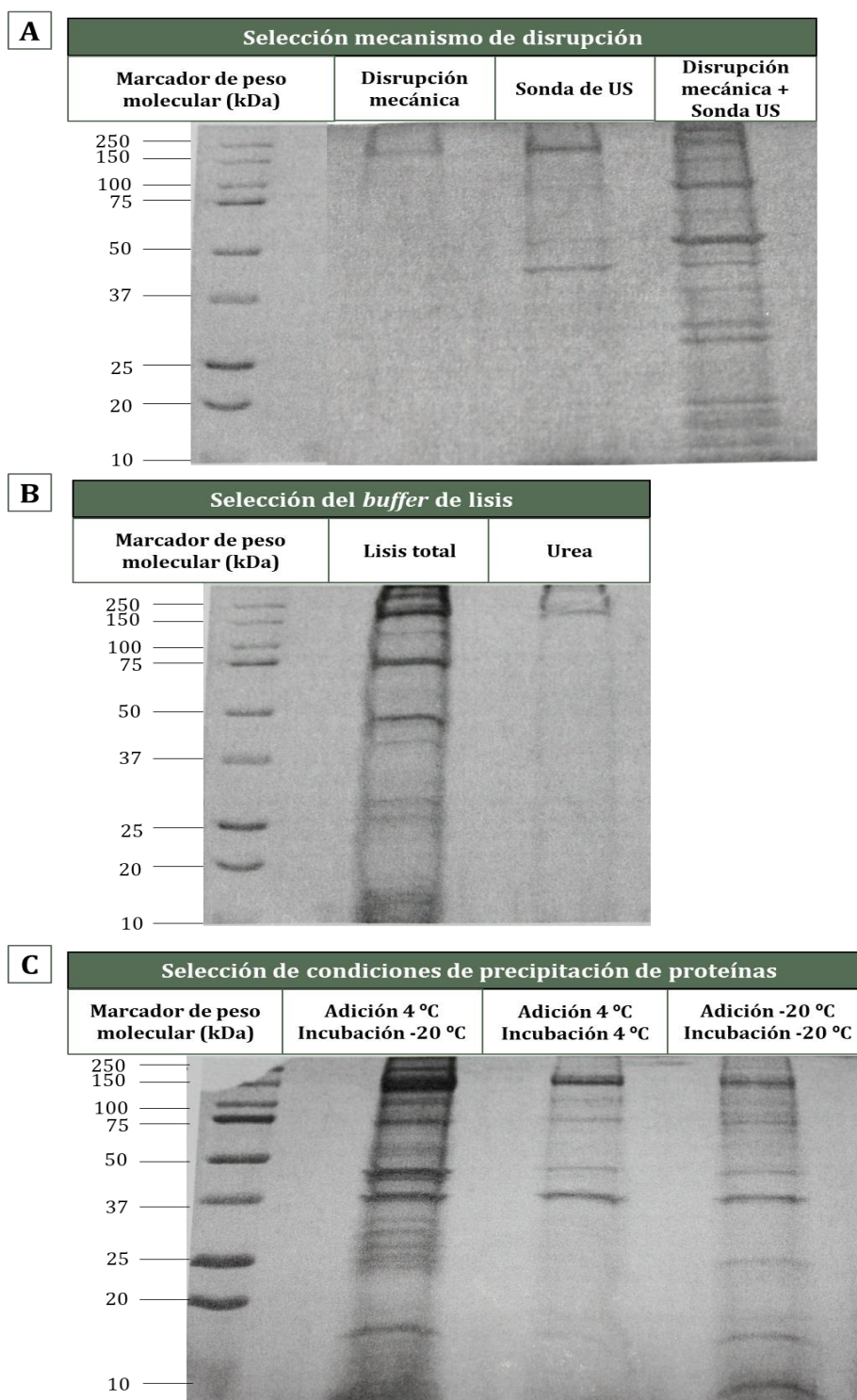


Figura 19. Imágenes de los geles SDS-PAGE donde se observa de forma cualitativa las proteínas extraídas de larvas de pez cebra empleando las diferentes condiciones evaluadas en las diferentes etapas: A, mecanismo de disrupción; B, composición del *buffer* de lisis; C, método de precipitación de proteínas. Todos los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

I. 1. f Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en larvas de pez cebra expuestas a QDs de CdSe/ZnS

El experimento super-SILAC se realizó con la finalidad de identificar proteínas alteradas en larvas de pez cebra tras ser expuestas a los QDs de CdSe/ZnS, para así, identificar los mecanismos moleculares de toxicidad relacionados y, por tanto, los procesos biológicos que se ven afectados por la exposición de las larvas a QDs durante su desarrollo. Se identificaron un total de 291 proteínas en las muestras de larvas expuestas a QDs y 269 en las larvas control, con un nivel de confianza del 99% ($p < 0,01$). Se estableció como criterio que todas las proteínas consideradas válidas se hubieran identificado con al menos dos péptidos únicos, es decir, dos péptidos que no se compartieran por ninguna otra proteína. De las proteínas identificadas, 45 pasaron los criterios de cuantificación fijados: un Mascot score superior a 46 para la proteína total ($p < 0,01$), y superior a 39 para los péptidos ($p < 0,05$). Además, estas 45 proteínas se identificaron en ambas muestras de larvas y en la mezcla super-SILAC formada por las líneas celulares marcadas, permitiendo así su cuantificación. En todos los casos, el error de cuantificación expresado como la desviación estándar relativa del R_{SILAC} de los péptidos empleados para cuantificar una determinada proteína, fue inferior al 20%, demostrando una alta precisión en los resultados generados. En este caso, y considerando la variabilidad intrínseca a un modelo *in vivo*, el umbral de R_{SILAC} se fijó en 1,50. Proteínas con un R_{SILAC} superior a 1,50 se consideraron sobreexpresadas, y proteínas con un R_{SILAC} inferior a -1,50 se consideraron inhibidas. Del total de proteínas cuantificadas, 28 se encontraron alteradas tras la exposición a los QDs, 12 de las cuales se encontraron sobreexpresadas y 16 inhibidas (**Tabla 5**).

Tabla 5. Proteínas expresadas diferencialmente en larvas de pez cebra expuestas a 2 mg/L de QDs de CdSe/ZnS durante 72h.

Número GI	Nombre de la proteína	R_{SILAC}	Mascot score	SILAC RSD (%)
18859049	myosin light chain	-10,00	99	2,73
528514754	myosin heavy chain, fast skeletal muscle	-5,88	6313	11,39
153792263	matrilin 1 precursor	-3,85	364	20,29

Número GI	Nombre de la proteína	R _{SILAC}	Mascot score	SILAC RSD (%)
239582731	tubulin, beta 2c	-2,70	986	19,54
18858295	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase alpha 1 subunit	-2,56	154	12,78
41054601	voltage-dependent anion-selective channel protein 2	-2,50	544	3,27
50512294	myosin, heavy polypeptide 2, fast muscle specific	-2,33	8651	10,69
48762657	alpha-enolase	-2,22	520	3,23
47085775	78 kDa glucose-regulated protein precursor	-2,17	456	3,42
300244539	tubulin, alpha 1, like 2	-2,04	660	16,81
56118264	actinin alpha 3a	-1,92	185	19,84
41053385	fast skeletal myosin alkali light chain 1	-1,85	504	17,01
41393119	transitional endoplasmic reticulum ATPase	-1,85	297	12,94
169259784	myosin, heavy polypeptide 1.1, skeletal muscle	-1,61	9282	17,68
66472252	slow myosin heavy chain 1	-1,52	775	19,37
528520560	slow myosin heavy chain 1 isoform X1	-1,52	1137	13,51
528484029	histone H2A-like	1,52	179	17,57
209571512	collagen type IX alpha I precursor	1,61	94	19,45
45387533	actinin alpha 3b	1,67	128	16,56
18858427	muscle creatine kinase a	1,8	661	11,45
48762667	collagen alpha-2(I) chain precursor	1,92	182	16,66
118150534	serine proteinase inhibitor, clade A, member 1 precursor	2,28	62	13,97
41054651	isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	2,58	162	17,91
27545277	elongation factor 1-gamma	2,59	398	19,77
160333682	heat shock cognate 71 kDa protein	2,63	788	18,59
193788703	protein disulfide-isomerase precursor	3,73	110	10,09
18859505	tropomyosin alpha-1 chain	4,73	81	16,40
55741944	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, fast twitch 1	7,21	301	17,73

Posteriormente, y con ayuda de la base de datos GO, se agruparon las proteínas expresadas diferencialmente según los procesos biológicos en los que participan (**Figura 20**). Se observa que son mayoritarias las proteínas que participan en el metabolismo de otras proteínas, en mecanismos de defensa, proteínas estructurales y proteínas relacionadas con el movimiento y la morfogénesis. Los resultados concuerdan con los encontrados en el modelo *in vitro*, y se discuten con mayor profundidad en la sección siguiente de forma conjunta.

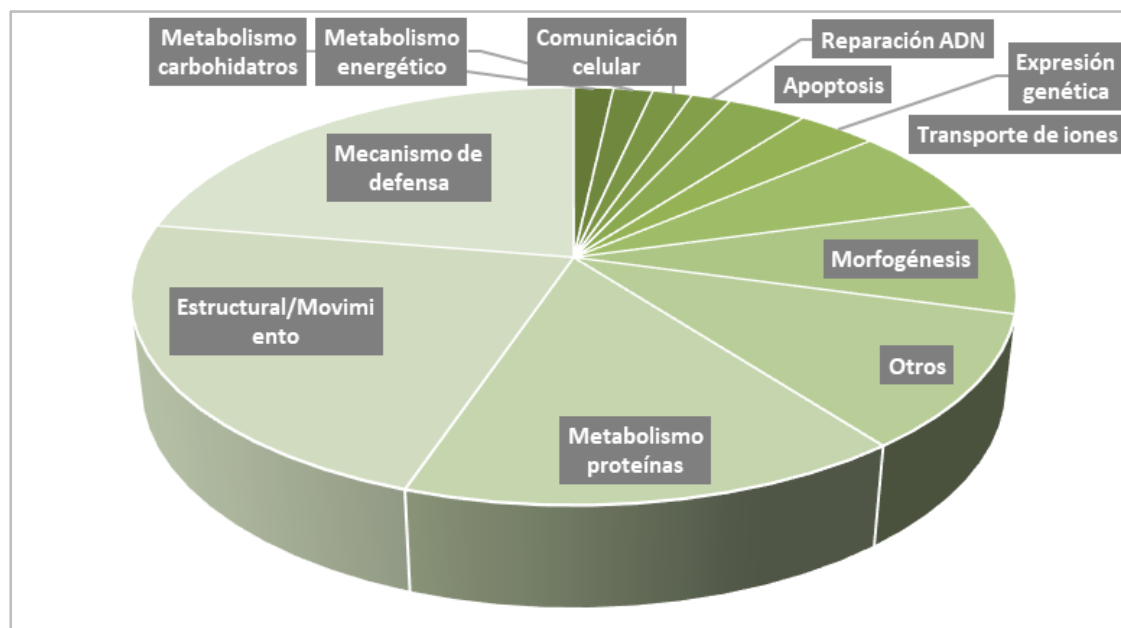


Figura 20. Principales procesos biológicos en los que están implicados las proteínas alteradas por efecto de los QDs en larvas de pez cebra. La información se ha obtenido de la base de datos GO.

I. 2 Discusión

A lo largo de este estudio, se han llevado a cabo diferentes ensayos bioanalíticos y dos estrategias de proteómica cuantitativa empleando un modelo *in vitro* (células HepG2) y uno *in vivo* (larvas de pez cebra) para, no sólo evaluar el potencial efecto tóxico de los QDs de CdSe/ZnS, sino también para poder elucidar los mecanismos biomoleculares subyacentes y responsables de los efectos tóxicos observados.

Así, se ha podido comprobar que los QDs de CdSe/ZnS no afectan por igual a todos los tipos celulares y que, como cabía esperar, la disminución de viabilidad celular, o lo que es lo mismo, el efecto citotóxico observado, es dependiente de la concentración de QDs empleada. Además, la disminución de viabilidad con el tiempo de exposición, observada en células HepG2, se ha podido relacionar con la capacidad de penetración de los QDs en dichas células, cuyo mecanismo de captación celular se elucidó previamente Zhang *et al.*, 2009, y cuya cinética de internalización se ha demostrado mediante las imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia. Se ha comprobado que los QDs de CdSe/ZnS son capaces de invadir el citoplasma celular en tan sólo 24 h, y que permanecen estables en el interior celular incluso tras 72 h de

exposición. Además, se ha observado que, a pesar de su pequeño tamaño, los QDs no son capaces de penetrar la membrana nuclear, lo que puede relacionarse con la relativamente baja toxicidad observada, especialmente a bajas concentraciones. Por otra parte, el empleo de la técnica de microscopía electrónica en combinación con la espectrometría de dispersión de rayos X, ha permitido establecer la localización intracelular de los QDs en vacuolas y en mitocondrias, fundamentalmente. Su localización en vacuolas se entiende, ya que una de las funciones de estos orgánulos es endocitar sustancias externas, y concretamente es uno de los mecanismos de entrada de estas NPs [165,166]. Asimismo, la presencia de los QDs de CdSe/ZnS en la membrana externa de mitocondrias, en las que se han visualizado crestas mitocondriales dañadas, demuestra el efecto tóxico que originan en dicho orgánulo, con la consecuente repercusión en el funcionamiento y viabilidad de las células.

En cuanto al experimento SILAC, realizado empleando las células HepG2 como modelo *in vitro* de exposición a los QDs, ha permitido demostrar la inhibición de proteínas estructurales y de otras proteínas relacionadas con el desarrollo de la célula. Entre ellas, se encontraron proteínas encargadas de la síntesis de otras proteínas, tales como la proteína ribosomal 60S ($R_{\text{SILAC}} = -1,47$). Pero también aparecieron alteradas proteínas cuya función es la degradación de otras proteínas, como en el caso la enzima E2 conjugadora de ubiquitina ($R_{\text{SILAC}} = -1,44$). Otras proteínas que resultaron inhibidas por efecto de los QDs desempeñan funciones relacionadas con el crecimiento y la proliferación celular, tal es el caso del factor de unión de serina/arginina ($R_{\text{SILAC}} = -1,36$). Además, se encontraron alteradas proteínas estructurales involucradas en la síntesis, crecimiento y regulación de proteínas de actina y tubulina. Entre ellas aparecieron inhibidas, la proteína F-actina ($R_{\text{SILAC}} = 1,39$), la cadena de actina citoplásmica 2 ($R_{\text{SILAC}} = -1,33$) y la tubulina beta-4B ($R_{\text{SILAC}} = -1,32$). Todas ellas son proteínas estructurales clave para las células, ya que se encargan de organizar el interior celular, brindando soporte mecánico y participando en procesos de comunicación celular, transporte, transducción de señales y migración [167].

Las disfunciones mitocondriales observadas en nuestro estudio ya habían sido detectadas al evaluar la toxicidad de otros QDs como los de CdS, donde se observó la importancia de la interacción entre las NPs y las proteínas de membrana,

relacionándose dicha interacción con la toxicidad mitocondrial [156,157]. Este mismo efecto tóxico se ha puesto de manifiesto en las malformaciones observadas, mediante TEM, en mitocondrias celulares expuestas a los QDs de CdSe/ZnS (**Figura 13**). Con los estudios de proteómica cuantitativa se ha confirmado la alteración de varias proteínas localizadas en el interior de la mitocondria tras la exposición a los QDs evaluados, muchas de ellas asociadas a una inducción de estrés oxidativo. Entre estas proteínas se encontró la aconitato hidratasa o aconitasa mitocondrial ($R_{\text{SILAC}} = 1,36$), cuya función es transformar el citrato en isocitrato como parte del ciclo de Krebs. La activación de esta proteína, en células expuestas a QDs, indica un aumento de la actividad oxidativa mitocondrial que contribuye al estrés oxidativo [168,169]. En el mismo sentido resultó sobreexpresada la proteína mitocondrial 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa ($R_{\text{SILAC}} = 1,31$), que cataliza la oxidación de ácidos grasos, y cuyo exceso se asocia a estrés mitocondrial, ya que promueve la síntesis de especies reactivas de oxígeno y la activación del ciclo de Krebs [170]. La inducción de estrés oxidativo por los QDs de CdSe/ZnS también se vio reforzada por la presencia de otras proteínas, igualmente sobreexpresadas, que se relacionan con la producción anormal de ROS. Estas proteínas son el complejo activador del proteasoma ($R_{\text{SILAC}} = 1,32$) y la subunidad 13 reguladora del proteasoma no-ATPasa ($R_{\text{SILAC}} = 1,37$). El conjunto del proteasoma controla la respuesta inflamatoria contra el antígeno y los niveles de oxidantes intracelulares, es decir, este complejo proteico se activa por la presencia de ROS, pero también podría ser activado por el agotamiento del GSH, una sustancia importante en la respuesta a nivel celular frente al estrés oxidativo [171]. Los QDs causaron la inhibición de la proteína encargada de la síntesis del GSH, la proteína glutatión sintetasa ($R_{\text{SILAC}} = -1,72$); esta inhibición supone un efecto negativo en las células haciéndolas más sensibles a ser dañadas por las ROS. Asimismo, otros indicadores de la sobreproducción de ROS como consecuencia de la exposición a los QDs es la sobreexpresión observada de la serina-treonina kinasa ($R_{\text{SILAC}} = 1,36$). Esta proteína tiene como función principal la transducción de la señal desde la superficie celular al núcleo, y se ha comprobado que se activa como consecuencia del estrés oxidativo para activar diferentes mecanismos de respuesta como la proliferación celular, la migración, la apoptosis o la respuesta inflamatoria [172].

Las mitocondrias son los principales orgánulos consumidores de oxígeno celular y, por tanto, se ha especulado durante años que son el sitio idóneo de localización y detección del mismo en el interior de la célula. Se sabe que muchas de las respuestas celulares a la hipoxia, falta de oxígeno, están mediadas por la producción de ROS en el complejo mitocondrial III de la cadena respiratoria [173]. Así, la sobreexpresión de algunas proteínas tras la exposición a QDs, puede relacionarse con el origen del fenómeno de hipoxia. Tal es el caso de la proteína aconitasa anteriormente mencionada [174] o de la proteína disulfuro isomerasa ($R_{SILAC} = 1,37$), miembro de la familia de la tiorredoxina, que es conocida como marcador celular de hipoxia [175].

Por otra parte, algunas de las proteínas que aparecieron sobreexpresadas son indicadores de muerte celular por apoptosis, en este caso inducida por exposición a los QDs de CdSe/ZnS. Entre estas proteínas se encuentra, por ejemplo, la proteína de muerte celular programada 5 ($R_{SILAC} = 1,48$), la cual no induce apoptosis directamente pero su activación se produce tras ser inducida una célula a apoptosis para acelerar el proceso [176,177]. Además, la apertura del canal aniónico dependiente del voltaje mitocondrial (VDAC), proteína que se encontró también sobreexpresada ($R_{SILAC} = 1,43$), da como resultado la liberación de citocromo c y otros factores pro-apoptóticos [178]; al igual que la proteína disulfuro isomerasa ($R_{SILAC} = 1,37$), que además de ser un marcador de hipoxia como se ha indicado anteriormente, se encarga de reparar proteínas dañadas en el retículo endoplásmico generalmente en condiciones de estrés oxidativo, es un indicador del malfuncionamiento mitocondrial y en caso de citotoxicidad alta induce la muerte celular por apoptosis [179–181]. Dentro de las diferentes vías apoptóticas activadas por la toxicidad de los QDs, cabe mencionar la vía en la que está implicada la proteína de unión a ADN TAR de 43 kDa (TDP-43) ($R_{SILAC} = 1,45$). Esta proteína participa en diferentes funciones relacionadas con la formación, unión y transporte de ARN. No obstante, su agregación se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas, y existen estudios donde se ha observado que la acumulación de esta proteína se asocia con la muerte celular bajo condiciones de estrés, por ejemplo, tras la exposición a H_2O_2 [182,183]. En este evento están implicadas la morfología y los mecanismos de obtención de energía alterados en las mitocondrias como consecuencia de la exposición a los QDs, tal y como se ha comentado [184]. En definitiva, los resultados indican que los QDs de CdSe/ZnS

originan un estrés celular capaz de activar la ruta molecular que induce toxicidad por sobreexpresión de la proteína TDP-43, y por activación de las proteínas kinasas que fosforilan ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP) ($R_{\text{SILAC}} = 1,30$ y $1,41$). La interacción de estas proteínas con el exceso de TDP-43 provoca su acumulación en gránulos de estrés que originan un agregado de proteína tóxica para las células, el cual, en sus últimas consecuencias, induce la muerte celular por apoptosis [185].

El daño estructural y energético observado tras la exposición a los QDs de CdSe/ZnS en el sistema *in vitro* empleado, se comprobó en un sistema *in vivo* utilizando en este caso la estrategia super-SILAC. Concretamente, se emplearon larvas de pez cebra como modelo, con objeto de evaluar el efecto de los QDs sobre el desarrollo de las mismas. Al igual que en el modelo *in vitro*, se vieron inhibidas proteínas estructurales cruciales para el desarrollo de las larvas de pez cebra. Entre ellas se encuentran proteínas como la alfa-tubulina 1 ($R_{\text{SILAC}} = -2,04$) y beta-tubulina 2c ($R_{\text{SILAC}} = -2,70$), que forman parte de los microtúbulos, el mayor componente del citoesqueleto. Concretamente la alfa-tubulina forma parte de los microtúbulos específicos de las neuronas. La inhibición de estas proteínas afecta al comportamiento locomotor de las larvas pero, sobre todo, al correcto desarrollo del cerebro [186,187]. Otras proteínas inhibidas como la alfa-actinina ($R_{\text{SILAC}} = -1,92$) une la membrana de células no musculares con la actina. Ésta, junto a la troponina y la familia de las miosinas, que también aparecen significativamente inhibidas: cadena pesada de la miosina lenta ($R_{\text{SILAC}} = -1,52$), cadena pesada de la miosina 1 y 2 ($R_{\text{SILAC}} = -1,61$, $-2,33$ y $-5,88$), cadena ligera de la miosina ($R_{\text{SILAC}} = -1,85$ y $-10,00$); desempeñan funciones clave a nivel celular como son la adhesión, la movilidad de vesículas y la motilidad. Pero también a nivel muscular y de organismo, ya que tienen un papel muy importante en la morfogénesis y miogénesis del pez cebra, así como en la utilización de ATP para generar el movimiento del organismo [188–190]. Además, la inhibición de la miosina 1 junto con la de la ATPasa de Na^+/K^+ ($R_{\text{SILAC}} = -2,56$) se ha relacionado con fallos renales, concretamente con problemas en la barrera de filtración del plasma sanguíneo en el glomérulo [189]. También se encontró alterada la proteína matrilina 1 ($R_{\text{SILAC}} = -3,85$), que forma parte del cartílago y otras matrices extracelulares, cuya deficiencia se ha relacionado con daños en las articulaciones y enfermedades que frenan el crecimiento [191]. El colágeno ($R_{\text{SILAC}} = 1,61$ y $1,92$) es otra de las proteínas de la matriz extracelular que se

ha visto sobreexpresada por efecto de la exposición a los QDs. La recuperación de esta matriz en el pez cebra permite un crecimiento sustancial de los axones y, en consecuencia, la recuperación del movimiento, es por ello que la sobreexpresión de estas proteínas refleja la activación del mecanismo de regeneración de las partes del organismo afectadas por los QDs [192,193]. En conjunto, la alteración de las proteínas estructurales mencionadas, justifica el problema en el desarrollo de las larvas expuestas a los QDs y en el correcto funcionamiento de sus órganos en formación.

Algunas proteínas alteradas por efecto de los QDs de CdSe/ZnS también tendrán consecuencias negativas en diversas funciones celulares y en los mecanismos de defensa de las larvas. Tal es el caso de la proteína de 78 kDa regulada por glucosa ($R_{\text{SILAC}} = -2,17$), que es capaz de inhibir el factor tisular que se activa por la presencia de un virus, factores de crecimiento, ROS o hipoxia, y con ello los posibles efectos protrombóticos celulares [194]. También se vieron afectadas las funciones de la ATPasa transicional del retículo endoplasmático ($R_{\text{SILAC}} = -1,85$), la cual participa en diversos procesos celulares que se verían afectados, tales como la degradación de proteínas dependientes de ubiquitina-proteasoma, la reconstrucción de la envoltura nuclear, el control transcripcional, la regulación del ciclo celular y la reparación del ADN dañado [195]. Otras funciones que pueden estar afectadas debido a la exposición a los QDs son la neurotransmisión, la contracción muscular y la remodelación ósea, debido a la sobreexpresión de la ATPasa de Ca^{2+} ($R_{\text{SILAC}} = 7,21$), proteína que se sobreexpresa como consecuencia de una deficiencia de Ca^{2+} , imprescindible para todas las actividades fisiológicas anteriormente mencionadas [196,197].

Por otro lado, otras proteínas alteradas en las larvas del pez cebra aparecieron sobreexpresadas como mecanismo de defensa contra el efecto tóxico de los QDs. Tal es el caso de la proteína de choque térmico 71 kDa ($R_{\text{SILAC}} = 2,63$), la cual regula mecanismos de defensa contra diferentes tipos de estrés [198] o la creatina kinasa ($R_{\text{SILAC}} = 1,80$), que participa en procesos de intercambio de energía y es activada por las proteínas de choque térmico en respuesta a agentes externos que puedan afectar el correcto funcionamiento del organismo [199,200]. También se encontró alterada la proteína serina inhibidora de proteasa ($R_{\text{SILAC}} = 2,28$), la cual se ha visto activada en respuesta a infecciones como un efecto inmunosupresor temprano, pudiendo también

relacionarse con la respuesta a la internalización de los QDs [201]. La sobreexpresión de la proteína disulfuro isomerasa ($R_{\text{SILAC}} = 3,73$) como consecuencia del efecto tóxico de los QDs, se relacionó con el origen de la muerte celular por apoptosis como consecuencia del estrés oxidativo [179–181] y también con el fenómeno de hipoxia, todo ello anteriormente observado en el modelo *in vitro* [175].

Por último, también se observó la alteración del ciclo de Krebs, relacionado con disfunciones mitocondriales. Esto es debido a la sobreexpresión de la proteína isocitrato deshidrogenasa ($R_{\text{SILAC}} = 2,58$), cuya función es transformar el isocitrato en 2-oxoglutarato. Esta activación del ciclo de Krebs se explica como un mecanismo de defensa frente a la hipoxia inducida por los QDs [202].

En base a todo lo expuesto, puede afirmarse que los QDs de CdSe/ZnS afectan a la estructura y al desarrollo celular y tisular, induciendo estrés oxidativo y activando, por tanto, los mecanismos de defensa contra estresores externos. El mecanismo de toxicidad asociado a la exposición de QDs que puede deducirse en el sistema *in vitro* se recoge en la **Figura 21.A**, y se basa principalmente en el daño observado sobre las mitocondrias, en las cuales se origina un estado de hipoxia celular [90]. El estado de hipoxia induce, a su vez, la generación de ROS de forma descontrolada que afecta a diferentes rutas metabólicas, tales como el ciclo de Krebs o la oxidación de los ácidos grasos. Además, debido a este estrés y falta de oxígeno, los QDs activan un mecanismo de toxicidad que implica la formación de agregados de la proteína TDP-43, lo que, junto con la sobreexpresión de otras proteínas, desencadena la activación de mecanismos de muerte celular por apoptosis. Por otra parte, la toxicidad de los QDs en el sistema *in vivo* (**Figura 21.B**) se refleja en la alteración de algunas proteínas mitocondriales en las que se confirma el estado de hipoxia, que de forma similar induce a la generación de ROS, responsables de la activación de diferentes mecanismos de defensa. Especialmente importante resulta la inhibición observada en este modelo de numerosas proteínas estructurales, lo que conlleva problemas asociados al desarrollo embrionario y al correcto funcionamiento de los órganos, especialmente en lo que se refiere a las funciones neuronales, renales y del aparato locomotor.

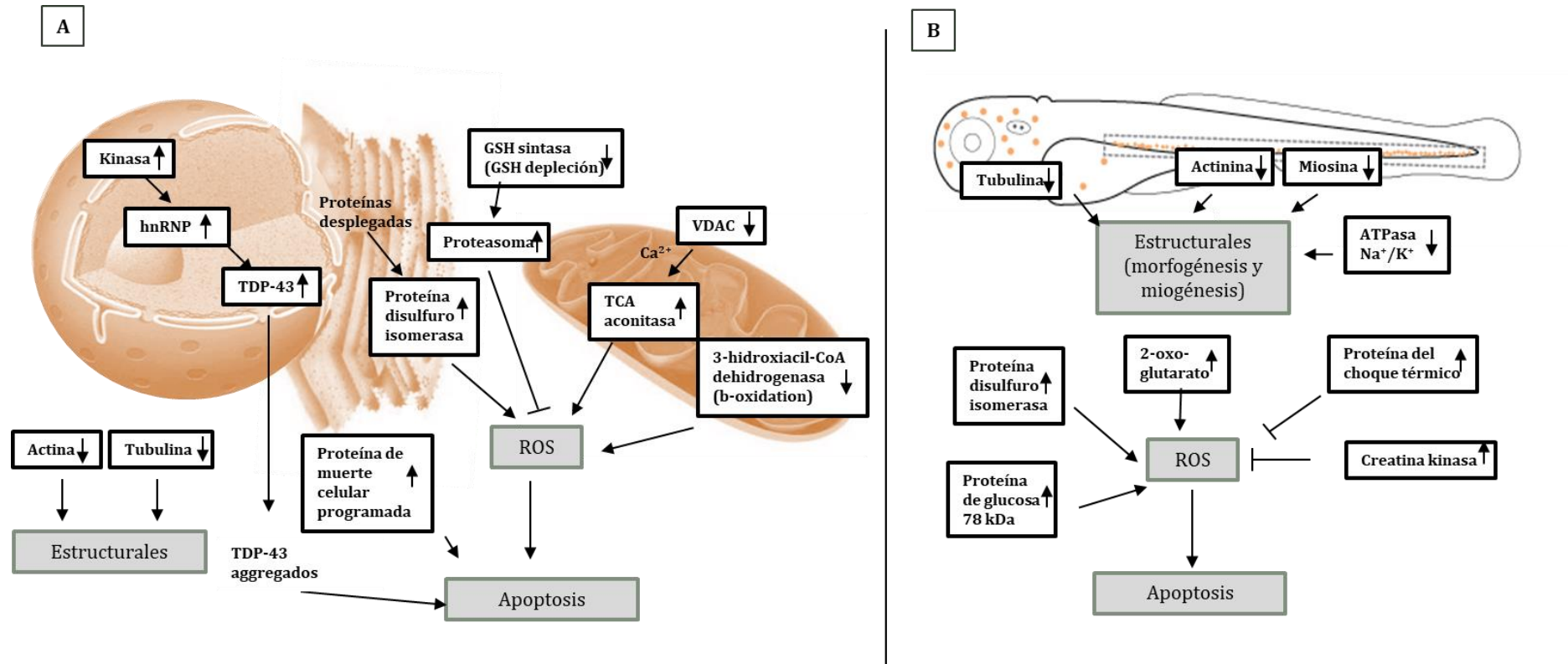


Figura 21. Resumen del mecanismo molecular asociado con la toxicidad de los QDs de CdSe/ZnS. Comparación de los resultados obtenidos en el modelo in vitro (A) vs el modelo in vivo (B).

II. ESTUDIOS DE TOXICIDAD DEL MeHg

II. 1 Resultados

Debido a la alta toxicidad atribuida al compuesto organometálico MeHg y a su contacto constante con el ser humano, se ha dedicado este capítulo a la investigación de su mecanismo de toxicidad. Así mismo, se ha investigado sobre el potencial del Se(IV) como paliador de los efectos tóxicos del MeHg. Las concentraciones seleccionadas para la realización de estos estudios están basadas en los resultados de viabilidad previamente realizados en nuestro grupo de investigación.

II. 1. a Optimización del método de extracción de metabolitos de un cultivo celular

La optimización de un método de extracción de los metabolitos de un cultivo celular se realizó con el objetivo de obtener el mayor número de metabolitos y con la mayor reproducibilidad posible, para posteriormente aplicarlo a los estudios de toxicidad. Existen numerosas publicaciones que utilizan diferentes métodos, la comparación de los métodos más empleados es de gran relevancia para aplicarlo a un sistema *in vitro* y obtener los mejores resultados.

Las etapas necesarias para la extracción de metabolitos de un cultivo celular se recogen en la **Figura 22**. Para todas las etapas de optimización existen algunos pasos comunes, independientemente de la metodología o disolventes empleados para la extracción, que se detallan a continuación: Antes de comenzar la extracción, se retiró el medio de cultivo y se lavó con 1 mL de NaCl al 0,9% (p/v) a temperatura ambiente. En este momento se colocaron las placas de cultivo sobre un baño de hielo para ralentizar el metabolismo celular y se comenzó con el protocolo. Tras la extracción se adicionó ácido 4-fenilbutírico como patrón interno y se llevó a cabo la derivatización como paso previo al análisis mediante GC-MS tal como se describe en el apartado de materiales y métodos 7. b.

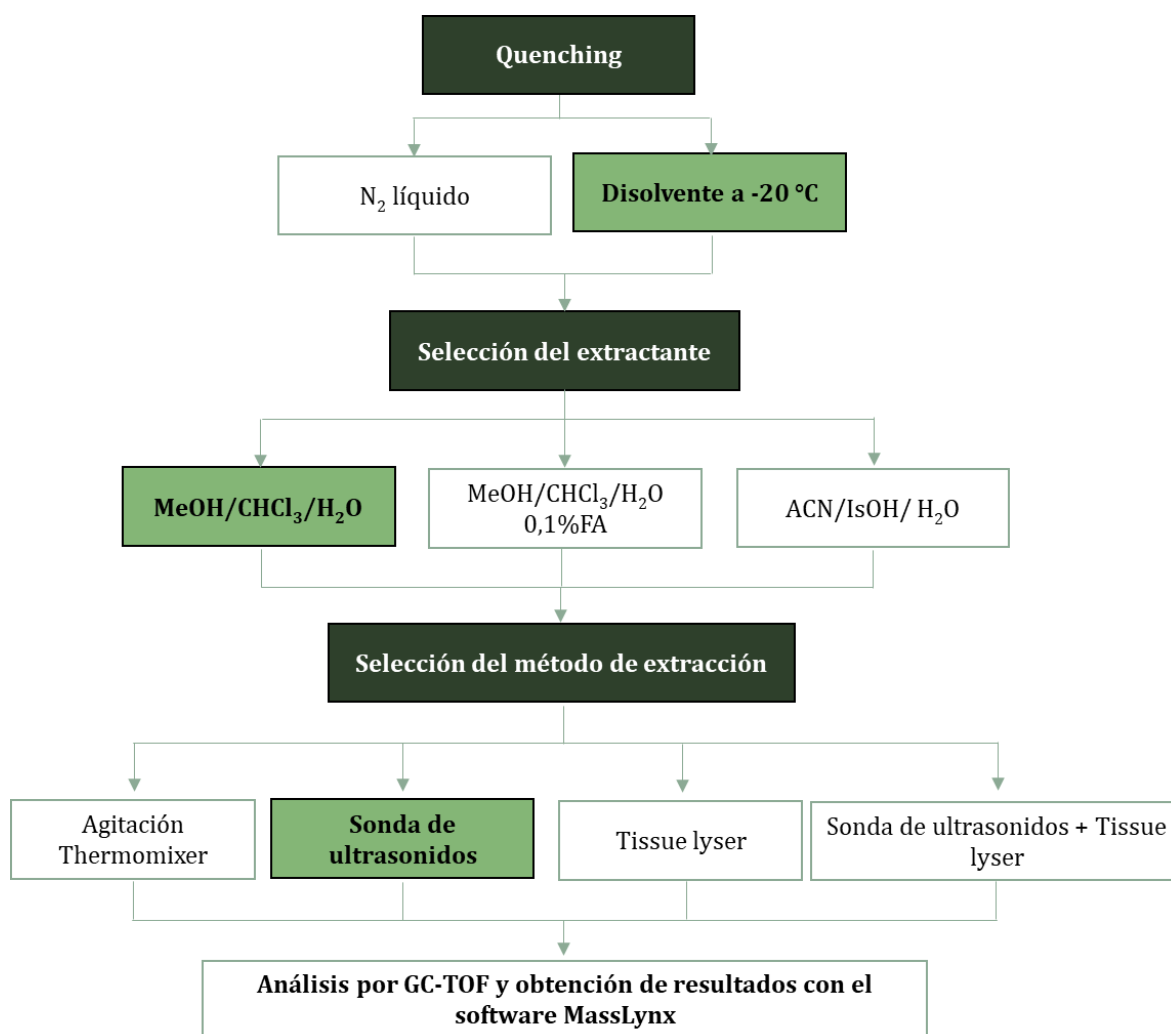


Figura 22. Esquema general de las diferentes etapas optimizadas y las condiciones evaluadas y seleccionadas como óptimas (en verde claro) para la extracción de metabolitos de un cultivo celular.

En la etapa de quenching, se compararon los efectos producidos sobre la parada del metabolismo, por la congelación inmediata de las células, mediante la adición de 5 mL de N₂ líquido sobre la placa de cultivo o mediante la adición directa de los disolventes empleados para la extracción a -20 °C. Como se puede observar en la **Tabla 6**, existen diferencias claramente significativas entre las dos condiciones. El empleo de N₂ líquido como método de quenching conlleva la pérdida de un gran número de metabolitos con respecto al empleo de disolventes a -20 °C. Si bien es cierto que se obtuvieron mayores áreas con la primera de las condiciones, la reproducibilidad se ve mejorada notablemente con el uso de disolventes fríos (segunda condición) en contraposición a

la congelación del ciclo metabólico con N₂ líquido. Es por ello que se seleccionó el disolvente a -20 °C como mejor opción para el proceso de quenching.

En la siguiente etapa se empleó el método de quenching seleccionado y se probaron diferentes mezclas de extractantes. En dos de las tres condiciones se añadieron 400 µL de MeOH, 400 µL de H₂O, se levantaron las células con un rascador y se transfirieron a viales Eppendorf; se añadieron a unas muestras 400 µL de CHCl₃ y a otras 400 µL de CHCl₃ y AF de forma que la concentración final de éste fuese del 0,1% (v/v). Para la tercera condición los disolventes utilizados fueron 600 µL de ACN, 600 µL de isopropanol (IsOH) y 200 µL de H₂O. Como se observa en los resultados recogidos en la **Tabla 6**, la extracción con ACN/IsOH/H₂O proporciona un mayor número de metabolitos extraídos y, además, con una menor desviación. Sin embargo, mediante esta mezcla de disolventes el área de los picos cromatográficos es significativamente menor, lo cual supone una menor eficiencia en la extracción. Por otro lado, las otras dos mezclas de disolventes empleadas son muy semejantes entre sí. La adición de ácido fórmico durante la extracción aumenta el área media obtenida, pero disminuye significativamente la reproducibilidad. La mezcla MeOH/CHCl₃/H₂O es la que presenta una mejor relación entre el número de metabolitos extraídos y la eficiencia de la extracción (área media normalizada), por lo que se seleccionó como condición de compromiso para los experimentos posteriores.

En la última etapa a optimizar, la etapa de disrupción celular, se emplearon el método de quenching y la mezcla de disolventes optimizados en las etapas anteriores. Como primera condición se empleó agitación vortex breve seguida de agitación en Thermomixer a 4 °C y 1400 rpm durante 20 min. Para la segunda condición, se sonicaron las muestras aplicando 20 pulsos de US (2 s de sonificado y 5 s de reposo por cada pulso) manteniendo las muestras en hielo para evitar la degradación de los metabolitos. Las muestras de la tercera condición se transfirieron a viales de 2 mL en los que se introdujeron 41 mg de bolitas de vidrio de 425-600 µm y se homogeneizaron en el Tissue Lyser durante 5 min con una frecuencia de agitación de 50 Hz. Por último, la cuarta condición combinó las condiciones empleadas en la segunda y la tercera (sonda de US y Tissue Lyser). Finalmente, entre todos los métodos de extracción, la asistida por US proporciona una buena reproducibilidad en comparación con los otros

tres métodos de extracción, además del máximo número de metabolitos identificados y de las áreas de pico más altas. Por lo tanto, se eligió este método de extracción como el más adecuado para futuros experimentos.

Tabla 6. Optimización del método de extracción de metabolitos de un cultivo celular.

Parámetro observado	Etapas a optimizar								
	Quenching		Extractante			Método de disrupción			
	N ₂ líquido	Disolvente a -20 °C	MeOH/CHCl ₃ /H ₂ O	MeOH/CHCl ₃ /H ₂ O 0,1% FA	ACN/IsOH/H ₂ O	Agitación	Sonda de US	Tissue lyser	Sonda de US + Tissue lyser
Área media normalizada (u.a.)	0,84	0,60	0,59	0,76	0,37	0,55	0,57	0,43	0,42
Nº de analitos	28	55	52	44	55	69	89	76	89
Analitos con %RSD < 20	11	30	40	21	48	47	59	52	52

II. 1. b Metabolómica no dirigida de células expuestas a MeHg

En primer lugar, se realizaron los estudios de metabolómica no dirigida en células expuestas a MeHg (n = 10). Tras los análisis realizados mediante GC-MS se identificaron un total de 47 metabolitos comunes entre controles y muestras tratadas con MeHg, presentes en un mínimo de cinco réplicas para ambos experimentos. Se muestra, a modo de ejemplo, en la **Figura 23** un cromatograma representativo de estos análisis, así como el espectro de MS del patrón interno utilizado (ácido 4-fenilbutírico), y la búsqueda realizada para su identificación. Para asegurar la fiabilidad de la identificación se consideró un valor mínimo NIST Rmatch de 700, consiguiendo la correcta identificación de metabolitos de diferente naturaleza: aminoácidos, ácidos grasos, azúcares, ácidos orgánicos y pequeñas moléculas.

Con los promedios de las áreas normalizadas de estos metabolitos identificados, se llevó a cabo el estudio estadístico de la t-Student ($p < 0,05$) que permitió encontrar diferencias significativas entre los niveles de los metabolitos de células control y células expuestas a MeHg. De todos estos metabolitos identificados, un total de 23 aparecieron alterados tras el análisis estadístico. Se puede observar en las **Tablas 7 y 8**, ordenados de mayor a menor nivel de alteración, que 19 de los metabolitos alterados presentaron niveles superiores, y 4 inferiores en células expuestas a MeHg con respecto al control. Además, en las tablas se indica el tiempo de retención cromatográfico en minutos y el Rmatch obtenido de la librería NIST que certifica la correcta identificación de cada uno de los analitos.

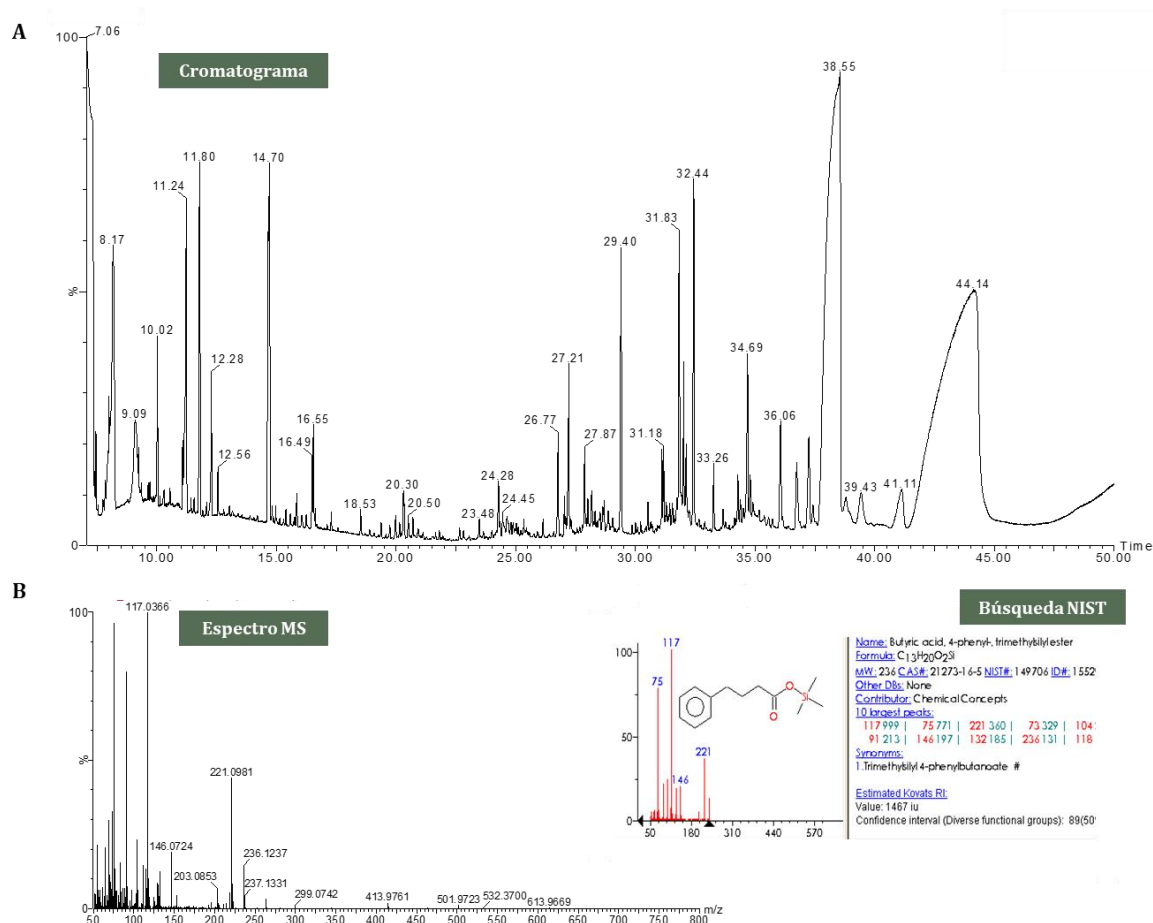


Figura 23. (A) Cromatograma total de los metabolitos obtenidos mediante metabolómica no dirigida de las células Neuro-2a. (B) Espectro de MS de impacto electrónico del ácido 4-fenilbutírico utilizado como patrón interno y de la búsqueda que confirma su correcta identificación.

Tabla 7. Metabolitos cuya concentración se ve aumentada significativamente en células Neuro-2a tras su exposición a MeHg (10 μ M).

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	NIST Rmatch	R _M (Área MeHg/Área control)
Ornithine	26,194	886	3,88
Aspartic acid	20,055	797	3,67
Glutamine	21,895	815	3,26
Propanoic acid	10,205	780	2,59
α -D-Manopiranos	24,685	736	2,43
Aminomalonic acid	18,975	846	2,36
Uridine	35,373	846	2,28
L-Isoleucine	15,218	854	2,01
2-Butenedioic acid	16,51	781	1,98
Hentriacontane	31,766	834	1,94
Phosphoric acid	12,592	766	1,92
Hexadecanoic acid	29,44	907	1,85
Nonacosane	31,208	828	1,73
Urea	14,427	796	1,70
11-cis-octadecenoic acid	32,045	871	1,60
Octadecanoic acid	32,458	868	1,60
D-glucose	26,933	805	1,57
Malic acid	19,399	840	1,47
Isocitric acid	25,605	776	1,34

Tabla 8. Metabolitos cuya concentración se ve disminuida significativamente en células Neuro-2a tras su exposición a MeHg (10 μ M).

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	NIST Rmatch	R _M (Área MeHg/Área control)
L-Proline	15,311	853	0,22
Erithrose	27,213	707	0,41
2,6,10,14-tetramethylhexadecane	24,304	839	0,67
L-Alanine	10,846	842	0,72

La **Figura 24** muestra la red de metabolitos alterados (en azul) en la especie *Mus musculus* y sus proteínas asociadas (en rojo). Como se puede observar, todos los metabolitos parecen estar conectados especialmente a través del fosfato y la glutamina, lo que sugiere que podrían ser los puntos clave en la vía de toxicidad del MeHg. Una discusión más detallada de estos resultados y de sus implicaciones en la toxicidad del MeHg se realiza al final de este capítulo de forma conjunta a los resultados obtenidos en células expuestas a MeHg-Se(IV).

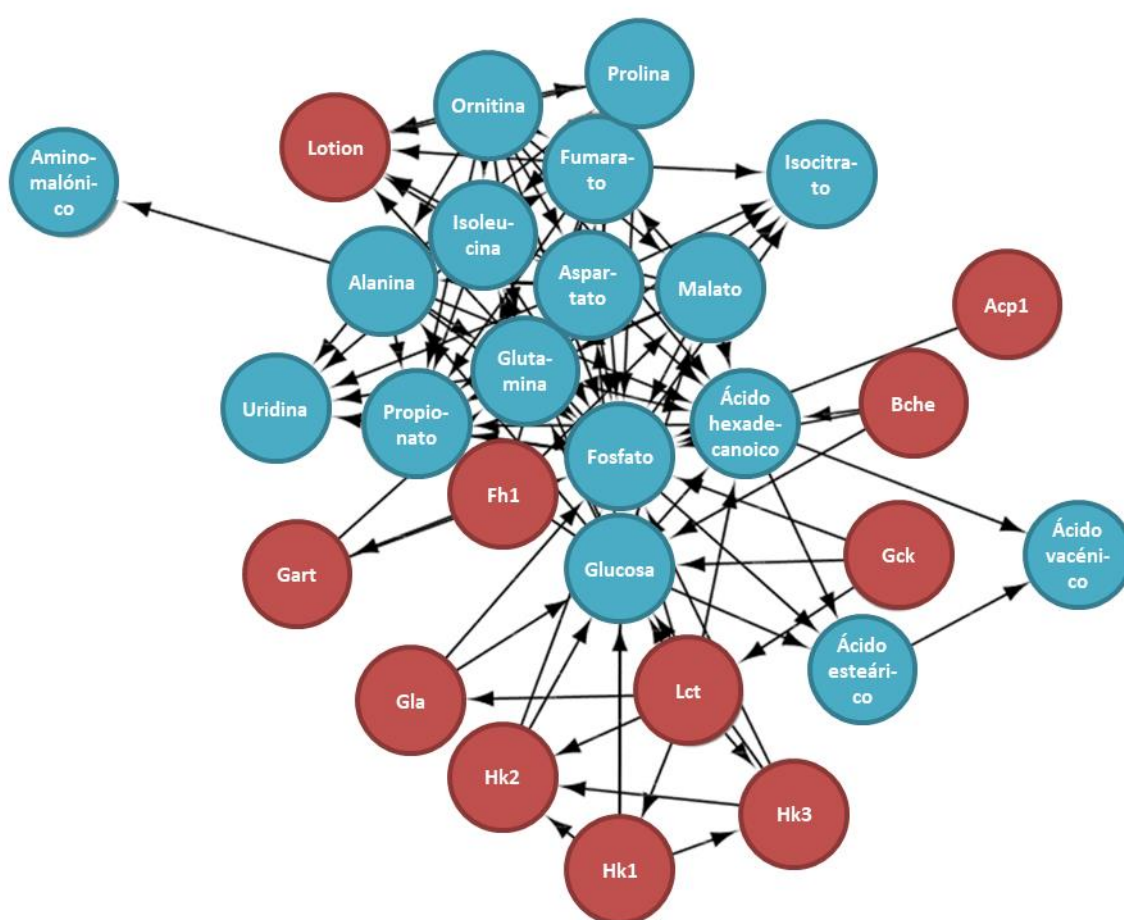


Figura 24. Red metabólica de conectividad de los metabolitos alterados estadísticamente tras la exposición al MeHg (valores de $p < 0,05$ con un nivel de confianza del 95%).

II. 1. c Metabolómica no dirigida de células expuestas a MeHg-Se(IV)

Para la obtención de los resultados del estudio de metabolómica no dirigida con células expuestas a MeHg-Se(IV) ($n = 10$) se siguieron los mismos criterios que en el apartado anterior II. 1. b. Se identificaron un total de 47 metabolitos comunes entre controles y muestras tratadas con MeHg-Se(IV). De igual forma, se realizó el estudio estadístico de la t-Student de dos colas ($p < 0,05$), utilizando las áreas promedio de los metabolitos identificados, lo que permitió encontrar aquellos metabolitos cuyos niveles se veían afectados. Se encontraron un total de 17 metabolitos alterados que se recogen en las **Tablas 9 y 10**, junto con el tiempo de retención y el Rmatch de cada compuesto. En la **Tabla 9**, aparecen los metabolitos cuya concentración aumenta por efecto de la co-exposición a MeHg-Se(IV), ordenados de mayor a menor nivel de alteración. Mientras que, en la **Tabla 10**, se recogen los 5 metabolitos cuya concentración disminuye por efecto de esta exposición.

Tabla 9. Metabolitos cuya concentración se ve aumentada significativamente en células Neuro-2a tras su exposición a MeHg ($10 \mu\text{M}$) y Se(IV) ($10 \mu\text{M}$).

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	NIST Rmatch	R _M (Área MeHg-Se/ Área control)
D-Galactose	26,701	879	5,24
D-Fructose	26,432	868	4,98
Aspartic acid	20,055	797	3,27
Propanoic acid	10,205	780	3,27
Glutamine	21,895	895	2,86
Ornithine	26,194	886	2,81
L-Proline	15,311	852	2,26
Aminomalonic acid	18,975	846	1,98
Urea	14,427	796	1,97
α -D-Manopiranoose	24,685	708	1,59
2-Butenedioic acid	16,510	781	1,51
Nonacosane	31,208	828	1,37

Tabla 10. Metabolitos cuya concentración se ve disminuida significativamente en células Neuro-2a tras su exposición a MeHg (10 μ M) y Se(IV) (10 μ M).

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	NIST Rmatch	R _M (Área MeHg-Se/ Área control)
Galactitol	27,486	805	0,39
Tetracosane	27,900	834	0,54
L-Alanine	10,846	851	0,59
11-cis-octadecenoic acid	32,045	871	0,67
Glycerol	36,185	732	0,68

La **Figura 25** muestra la red de metabolitos alterados (en azul) en la especie *Mus musculus* y sus proteínas asociadas (en rojo). Como se puede observar, todos los metabolitos parecen estar conectados especialmente a través del glicerol, lo que sugiere que podrían ser el punto clave en la co-exposición de las células a MeHg y Se(IV). Al igual que en el caso anterior, una discusión más detallada de estos resultados se realiza de forma conjunta al final del capítulo.

II. 1. d Análisis quimiométrico de los resultados de metabolómica no dirigida de células expuestas a MeHg y MeHg-Se(IV)

Para detectar patrones y visualizar fácilmente las alteraciones metabólicas entre los diferentes grupos experimentales: muestras control, muestras expuestas a MeHg y muestras expuestas a MeHg-Se(IV); los datos se sometieron a un análisis de componentes principales (PCA). Esta herramienta quimiométrica reduce la dimensionalidad de los datos multivariados a dos o tres componentes principales (PCs), que pueden ser visualizados gráficamente con mínima pérdida de información. Para ello, la matriz de datos se descompuso en matrices de scores (coordenadas de las muestras) y loadings (metabolitos), proporcionando información sobre muestras y variables, respectivamente.

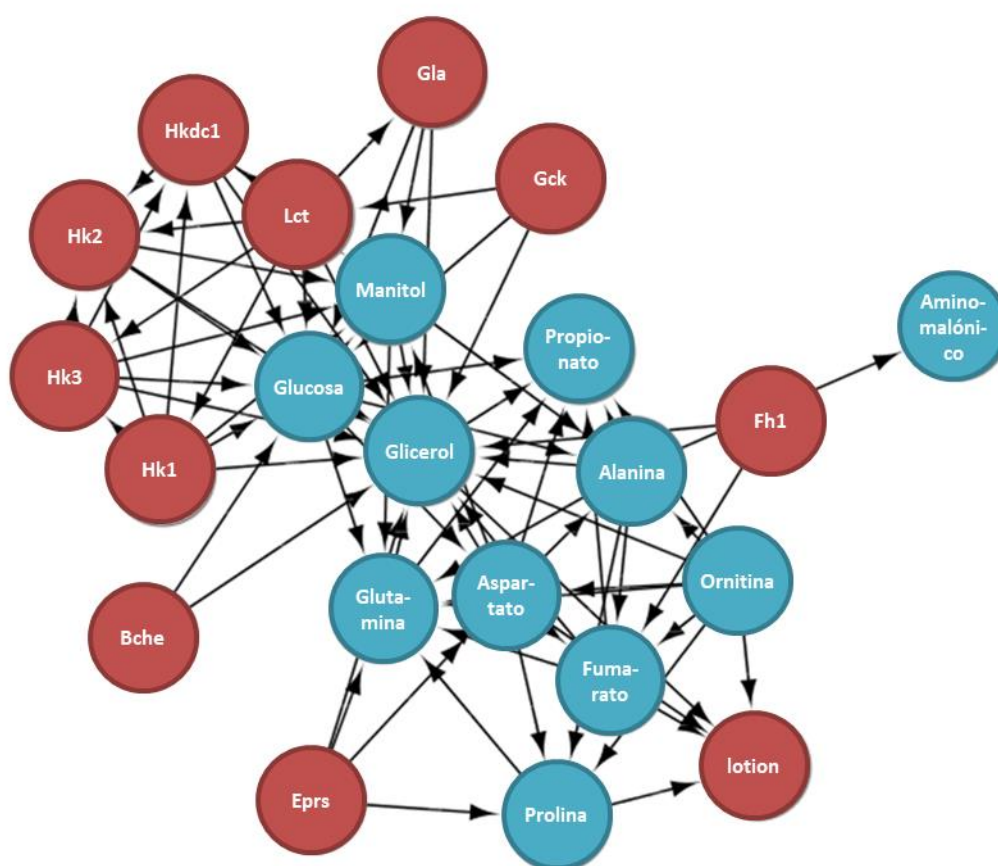


Figura 25. Red metabólica de conectividad de los metabolitos alterados estadísticamente tras la exposición a MeHg y Se(IV) (valores de $p < 0,05$ con un nivel de confianza del 95%).

En este estudio exploratorio, dos componentes principales explicaron el 63% de la varianza acumulada. El gráfico de dispersión de los scores (**Figura 26**), obtenido para el modelo de PCA utilizando las áreas de pico normalizadas de los metabolitos, permitió determinar las diferencias metabólicas entre la población control y la población expuesta a MeHg. Como puede observarse, las muestras control ($n = 10$) se agrupan y se colocan en la dirección opuesta a las muestras de células expuestas a MeHg, lo que permite discriminar las células expuestas al compuesto organometálico de las células control. Por otro lado, se refleja que la población celular expuesta a MeHg-Se(IV) comparte similitudes con la población control, pero también con la población afectada por el MeHg. Este hecho confirma que, de algún modo, las células se ven alteradas por el efecto tóxico del MeHg y que el Se(IV) posee un efecto protector y,

por ello, esta población celular comparte similitudes con las otras dos poblaciones celulares. Además, la agrupación de los scores pertenecientes a la misma población indica una reproducibilidad fiable durante la preparación y el análisis de las muestras en los tres casos. El hecho de que las poblaciones control y las expuestas a MeHg tengan un comportamiento bien diferenciado, demuestra que el análisis de PCA es una buena herramienta estadística para diferenciar células control de células expuestas a MeHg.

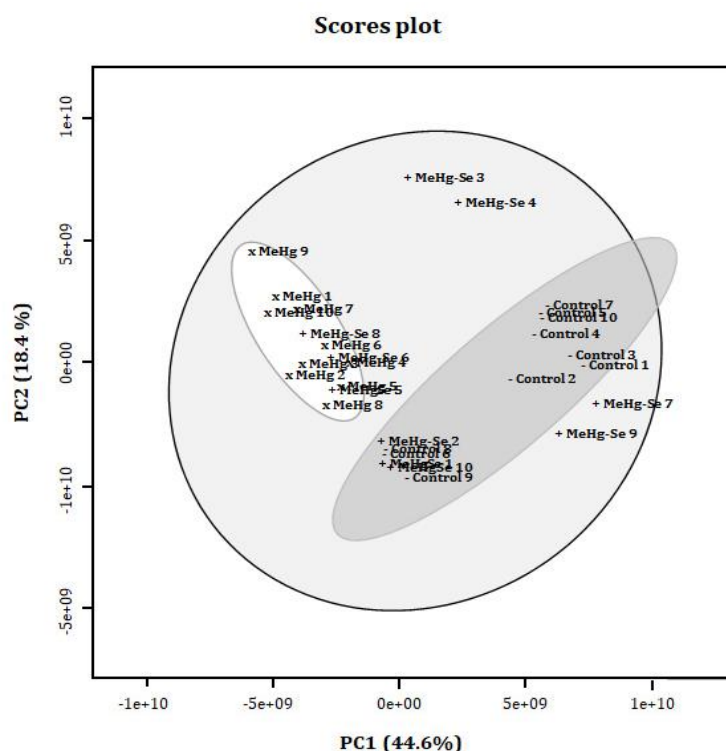


Figura 26. Representación del análisis multivariante de PCA para los metabolitos encontrados en células Neuro-2a control y expuestas a MeHg y a MeHg-Se(IV) ($n = 10$).

II. 1. e Optimización del método de metabolómica dirigida para la determinación de ATP, ADP, NADH y NAD⁺ procedente de un cultivo celular

La determinación simultánea de ATP, ADP, NADH y NAD⁺ en un cultivo celular resulta realmente importante para estudios toxicológicos en los que pueda verse afectado el

metabolismo energético. El gran número de publicaciones existentes destinadas a la extracción y/o identificación de alguno de ellos dificulta la elección de un método analítico adecuado. Es por ello que, durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se decidió optimizar un método que permita extraer y cuantificar los cuatro metabolitos de un cultivo celular simultáneamente de forma sencilla, dirigida y asegurando que no se produce modificación de las especies durante el proceso analítico. Las etapas necesarias para la cuantificación de ATP, ADP, NADH y NAD⁺ de un cultivo celular, las condiciones evaluadas y las condiciones óptimas se recogen en la **Figura 27**.

El equipo más adecuado y, por tanto, seleccionado para la identificación y cuantificación de los metabolitos consistió en un analizador de masas de triple cuadrupolo acoplado a un cromatógrafo de líquidos. Es por ello que, en primer lugar, y antes de optimizar las diferentes etapas de extracción, se realizó la selección de las transiciones MRM empleando patrones puros de cada compuesto (Sigma-Aldrich) disueltos en 20% de MeOH, los cuales se analizaron en Q1 en modo *full-scan* negativo con un rango de masas de 100-1000 m/z utilizando 0,309 min como tiempo de escaneo. La optimización de la energía de colisión para cada ion precursor (ATP = 506,00; ADP = 426,00; NADH = 664,10; NAD⁺ = 662,10) se llevó a cabo incrementando su valor progresivamente desde 10 hasta 50 V en la celda de disociación inducida por colisión (CID-Q2). Los fragmentos de los iones se detectaron en Q3 para obtener finalmente las transiciones Q1/Q3 de cada analito. Así mismo la energía de colisión (CE) se optimizó para cada uno de los fragmentos. En la **Figura 28** se muestra el espectro de MS/MS de cada uno de los compuestos de interés a las CE que permiten la visualización de los tres fragmentos óptimos en cada caso. Para todas estas pruebas se empleó N₂ como gas de nebulización (1,5 L/min) y de secado (15 L/min), mientras que como gas de colisión se utilizó Ar (17 kPa). El voltaje del capilar de la fuente ESI se fijó en 4,5 kV y la temperatura de la línea de desolvatación (DL) a 250 °C.

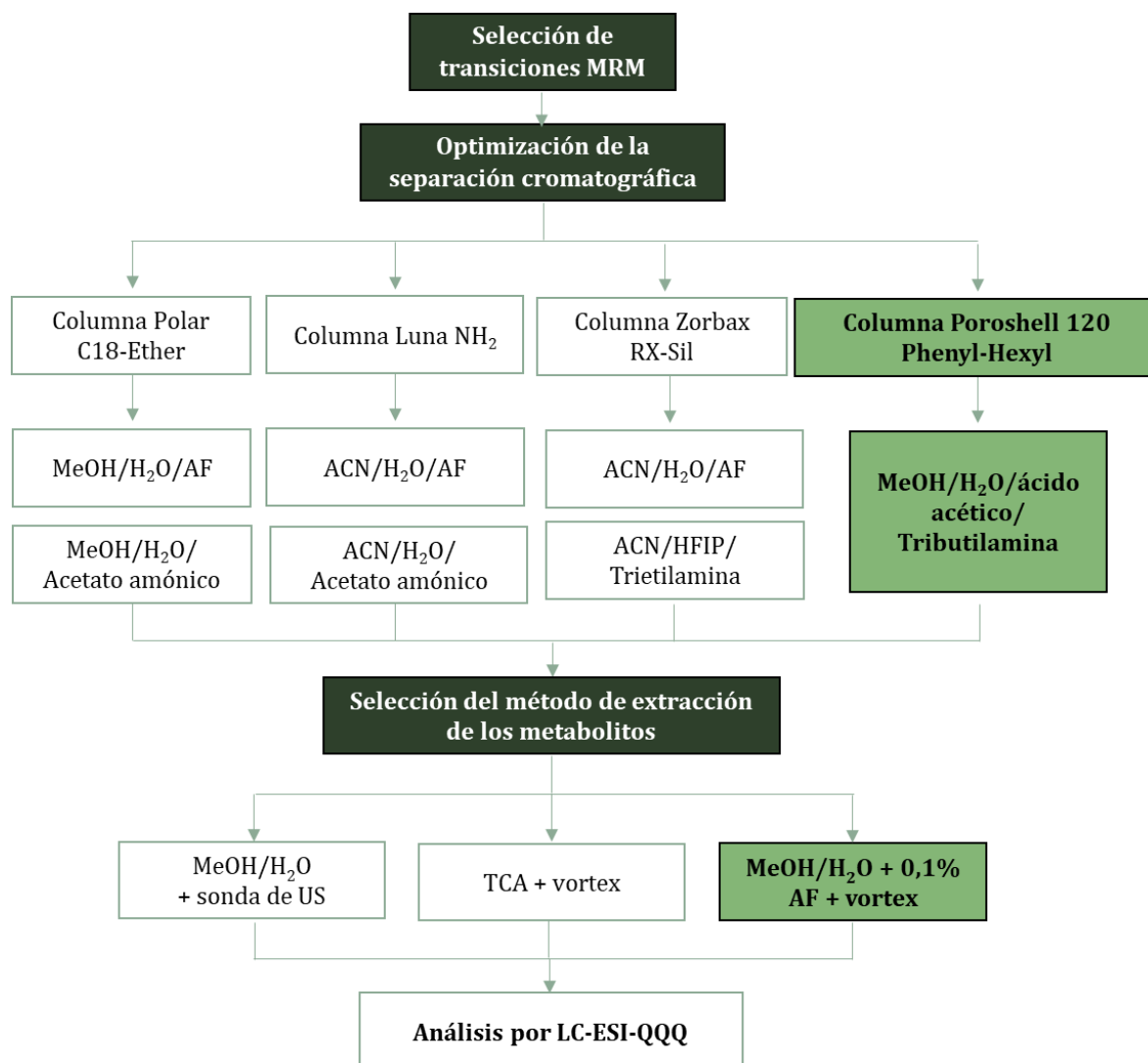


Figura 27. Esquema general de las diferentes etapas optimizadas y las condiciones evaluadas y seleccionadas como óptimas (en verde claro) para la cuantificación de ATP, ADP, NADH y NAD⁺ extraídos de un cultivo celular.

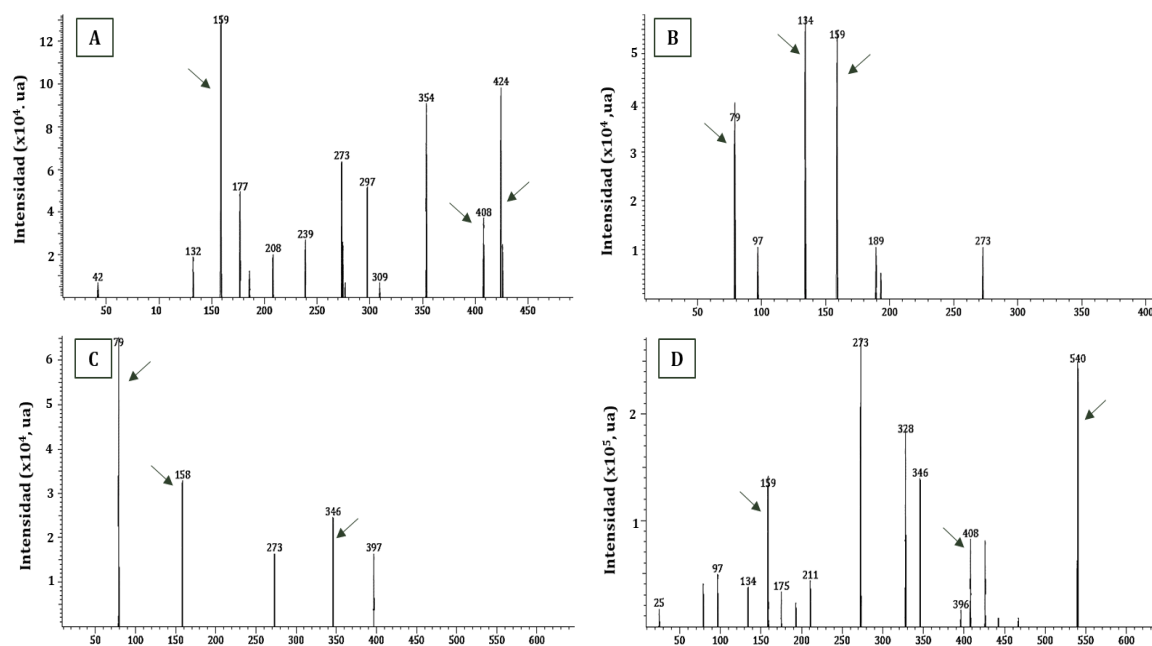


Figura 28. Espectros de MS/MS obtenidos a diferentes energías de colisión para la optimización de cada uno de los metabolitos. A, espectro de MS/MS del ATP, CE = 20 V. B, espectro de MS/MS del ADP, CE = 25 V. C, espectro de MS/MS del NADH, CE = 40 V. D, espectro de MS/MS del NAD⁺, CE = 25 V. Las flechas señalan los fragmentos seleccionados para cada metabolito.

Las transiciones MRM para cada compuesto se seleccionaron en base al fragmento de mayor peso molecular y mayor intensidad. De las transiciones que se seleccionaron, la de mayor intensidad correspondió con la transición cuantificadora, mientras que la otra se utilizó como transición cualificadora para la confirmación de la identidad del compuesto a determinar. En la **Tabla 11** se muestran las transiciones MRM para cada uno de los compuestos de interés.

Tabla 11. Transiciones MRM empleadas para la determinación de ATP, ADP, NADH y NAD⁺.

Compuesto	Tipo de transición	Ion precursor (m/z) [M-H] ⁺	Ion producto (m/z)	Energía de colisión (V)
ATP	cuantificadora	506,00	426,00	30
	cualificadora		408,00	21
ADP	cuantificadora	426,00	158,75	26
	cualificadora		134,15	25
NADH	cuantificadora	664,10	78,95	54
	cualificadora		346,05	35
NAD⁺	cuantificadora	662,10	540,00	16
	cualificadora		407,90	30

La optimización de la separación cromatográfica de los cuatro compuestos se fundamentó en la bibliografía existente [203–205]. No obstante, los ensayos llevados a cabo con algunas de las columnas descritas en la literatura, de diferentes tipos y polaridades, no dieron lugar a resultados satisfactorios. Las columnas evaluadas fueron: Polar C18-Ether (Agilent), Luna NH₂ (Phenomenex) y Zorbax RX-Sil (Agilent). Con estas columnas se probaron fases móviles con MeOH o ACN y H₂O, y usando AF o acetato amónico como modificadores. En todos los casos, y a pesar de probar diferentes rampas cromatográficas, no se consiguió la retención diferencial y, por tanto, la separación de los cuatro analitos.

Este problema se intentó solucionar con la utilización de un agente par iónico positivo que ayudase a retener los compuestos a separar en la fase estacionaria, haciéndolos más apolares, ya que todos estos analitos tienen grupos fosfato que les confieren carga negativa. En primera instancia se probó con la columna Zorbax RX-Sil (Agilent) y trietilamina como agente par iónico, además se utilizó el hexafluoroisopropanol para ayudar a la ionización [206]. Con ello se consiguió la retención de los compuestos,

aunque no fue suficiente para separar NADH y NAD⁺ y la resolución de los picos tampoco fue satisfactoria.

Finalmente, se evaluó la separación con una columna Poroshell 120 Phenyl-hexyl (Phenomenex) que presenta alta afinidad por compuestos con grupos aromáticos, cíclicos o altamente hidrofóbicos. Además de eso también se utilizó un agente de par iónico, la tributilamina, y ácido acético como agente modificador de la fase móvil acuosa para ayudar a la ionización y a ajustar el pH [203,207]. Ajustando el gradiente con MeOH, para minimizar el tiempo del cromatograma, pero manteniendo la separación de los cuatro metabolitos, se obtuvo el resultado que se muestra en la **Figura 29**.

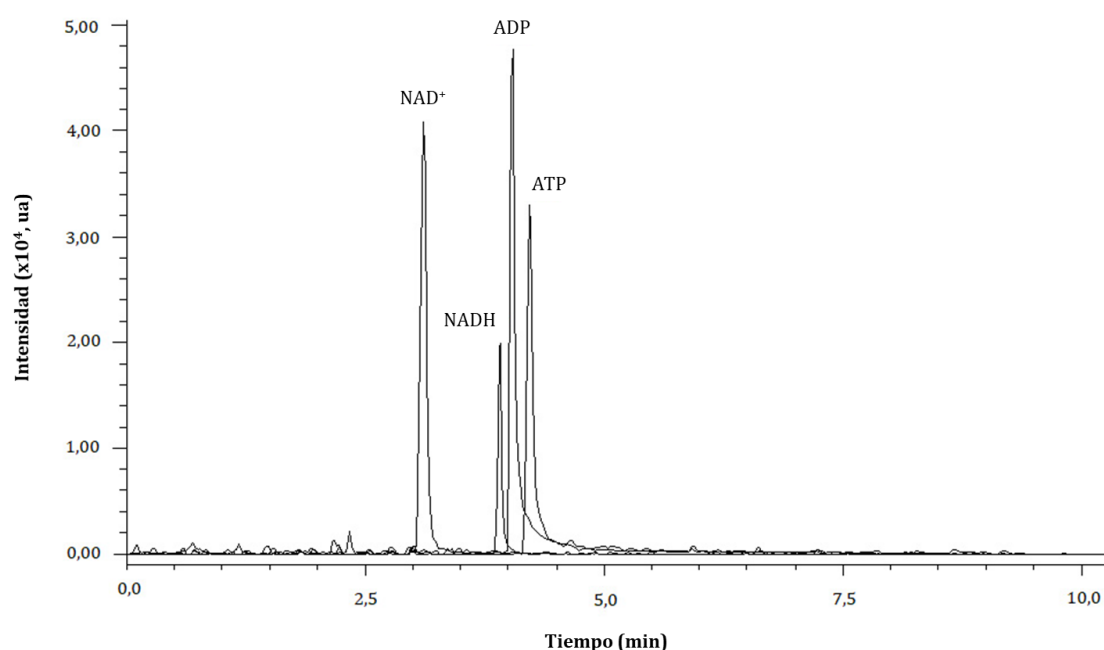


Figura 29. Cromatograma típico obtenido empleando las condiciones óptimas para la separación cromatográfica de ATP, ADP, NADH y NAD⁺.

Una vez optimizadas las condiciones del método, se procedió a determinar sus características analíticas. Se evaluó la reproducibilidad, linealidad y sensibilidad del método empleando mezclas de patrones puros con concentraciones entre 50 µg/L y

10.000 µg/L de cada analito. Se calcularon los coeficientes de correlación lineal de las curvas patrón mediante el análisis de regresión para cada metabolito. Los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) se estimaron utilizando el área de la transición MRM cuantificadora, como tres o diez veces la relación de esta señal entre el cociente señal-ruido (S/N) obtenido, respectivamente. La S/N se estableció basándonos en la línea base residual obtenida de concentraciones alrededor del LOD. Para evaluar la precisión del método propuesto se obtuvo la repetibilidad (Rpt) calculando el %RSD de quintuplicados de dos concentraciones diferentes (100 y 1000 µg/L) obtenidos en cinco días distintos (N = 25). El efecto memoria (carry over) también se expresó como el %RSD de las mismas muestras patrón inyectadas de forma consecutiva seis veces.

Los límites de detección alcanzados para los diferentes metabolitos fueron: $LOD_{ATP} = 7,7 \text{ µg/L}$; $LOD_{ADP} = 18,6 \text{ µg/L}$; $LOD_{NADH} = 5,4 \text{ µg/L}$; $LOD_{NAD^+} = 6,4 \text{ µg/L}$. En el caso de los límites de cuantificación se obtuvieron los siguientes resultados: $LOQ_{ATP} = 25,5 \text{ µg/L}$; $LOQ_{ADP} = 62,1 \text{ µg/L}$; $LOQ_{NADH} = 49,3 \text{ µg/L}$; $LOQ_{NAD^+} = 20,3 \text{ µg/L}$. La linealidad del calibrado cubrió más de dos órdenes de magnitud para todos los analitos. La **Tabla 12** resume los resultados del efecto memoria (carry over) expresados como %RSD. Puesto que este valor resultó inferior al 8,9% para todos los analitos, se demuestra la ausencia de efecto memoria. Además, esta misma tabla refleja la buena precisión del método, debido a la poca variación en el análisis de la misma concentración de patrón, preparada y analizada en el mismo día y en días diferentes. En todos ellos el RSD fue inferior al 20%. Como era de esperar este valor de variación fue máximo para valores de repetibilidad obtenidos en días diferentes, por ello el análisis de las muestras y de todos los patrones que forman el calibrado externo se realizaron en el mismo día.

Tabla 12. Parámetros analíticos que resumen la precisión y exactitud del método de análisis, así como el tiempo de retención y el efecto memoria (carry over) de cada compuesto. Rpt, corresponde con los resultados de repetibilidad.

Analito	Tiempo retención (min)	Concentración testada (µg/L)	Efecto memoria, RSD (%)	Rpt en el día (n = 5) RSD (%)	Rpt entre días (N = 25) RSD (%)
ATP	4,226	100	8,1	9,0	7,9
		1000	8,9	3,4	11,3
ADP	4,068	100	5,6	4,0	11,8
		1000	4,2	2,5	17,3
NADH	3,952	100	6,9	3,0	7,5
		1000	3,3	2,8	19,3
NAD ⁺	3,144	100	5,2	3,0	15,0
		1000	5,2	3,0	15,9

En la última etapa de la optimización se evaluaron tres protocolos de extracción de los cuatro metabolitos de células, basados en protocolos descritos en la literatura, y que se resumen a continuación:

1. Método con metanol y sonda de US: Se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con 0,9% (p/v) NaCl, y se añadieron 350 µL de 60% (v/v) de MeOH en agua. Después se levantaron las células con rascador y se sonicaron con sonda de US con 20 pulsos de 2 s y 5 s entre pulsos. Tras la adición de 350 µL de agua fría y agitación vortex de 1 min, se centrifugaron a 13.000 rpm y 4 °C durante 5 min. Guardando el sobrenadante, se volvió a extraer el pellet con 350 µL de agua fría y tras una nueva centrifugación se juntaron los sobrenadantes y se filtró la muestra con filtro de PTFE de 0,22 µm [154]. Este protocolo de extracción no resultó útil, ya que el NADH se oxidó por completo a NAD⁺.
2. Método con ácido tricloroacético (TCA): Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con 0,9% (p/v) de NaCl. Tras adicionar 150 µL de TCA al 6% (p/v) se levantaron las células con un rascador. Después, se agitaron con vortex y se mantuvieron a 4 °C durante 20 min. A continuación, se separó el sobrenadante mediante centrifugación a 13.000 rpm y 4 °C durante 5 min y se

neutralizó con KOH 0,5 M. La muestra se filtró, al igual que en el caso anterior, con filtro de 0,22 μm , antes de ser analizada [208]. Este protocolo tampoco impidió la oxidación del NADH; además, la cantidad de ADP disminuye notablemente, razones por la cuales también se descartó.

3. Método con ácido fórmico: Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con 0,9% (p/v) de NaCl. En primer lugar, se adicionaron 100 μL de MeOH a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y tras recoger las células con un rascador se añadieron 400 μL de agua fría que contenía 0,4% (v/v) de AF y se agitaron con vortex durante 1 min. Después de incubar 3 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ se añadieron 45 μL de NH_4HCO_3 al 15% (p/v) para neutralizar las muestras. Para esta etapa de neutralización se incubaron de nuevo las muestras a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero esta vez con una duración de 20 min. Antes de analizar las muestras, éstas se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min y se filtraron a través de membranas de PTFE con un tamaño de poro de 0,22 μm [154]. En este caso, se consiguieron extraer todos los metabolitos y en casi todos ellos con una intensidad superior a los otros métodos evaluados. Por tanto, se seleccionó este método para la extracción de los cuatro metabolitos.

II. 1. f Metabolómica dirigida

Algunos de los principales metabolitos energéticos que participan en rutas metabólicas como la glicólisis, el ciclo de Krebs o la cadena respiratoria, todas ellas alteradas por el MeHg, no se identificaron mediante la estrategia de metabolómica no dirigida. Este es el caso del ATP, ADP, NADH y NAD^+ , todos ellos a priori alterados por el efecto tóxico del MeHg. Esta identificación no se consiguió debido a que las técnicas de preparación y análisis de las muestras no eran específicas ni adecuadas para estos analitos concretos. Con el objeto de observar el efecto protector del Se(IV) y relacionarlo con los niveles de concentración de estos cuatro metabolitos energéticos, se aplicó el método de metabolómica dirigida, previamente optimizado, a células Neuro-2a control y expuestas.

Los cuatro metabolitos se determinaron y cuantificaron en 5 réplicas de células control y células expuestas a MeHg y a MeHg-Se(IV) (**Figura 30**). La concentración obtenida para cada metabolito se normalizó con el contenido proteico presente en cada muestra. Este valor se calculó mediante el método Bradford ya que es proporcional al número de células presentes en cada réplica. El estudio estadístico ANOVA se realizó con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$) y el posterior test de Bonferroni que demostraron que las diferencias observadas entre células control y células tratadas eran significativas. La **Figura 30** muestra la disminución de la concentración media de ATP, NADH y NAD⁺ de las células expuestas a MeHg con respecto a las células control. Así mismo, se demuestra el efecto protector del Se(IV) recuperando los niveles basales de NAD⁺ y aumentando significativamente los niveles de NADH, incluso respecto al control. Sólo el nivel de ATP permaneció alterado, aunque en menor proporción que en células expuestas únicamente a MeHg.

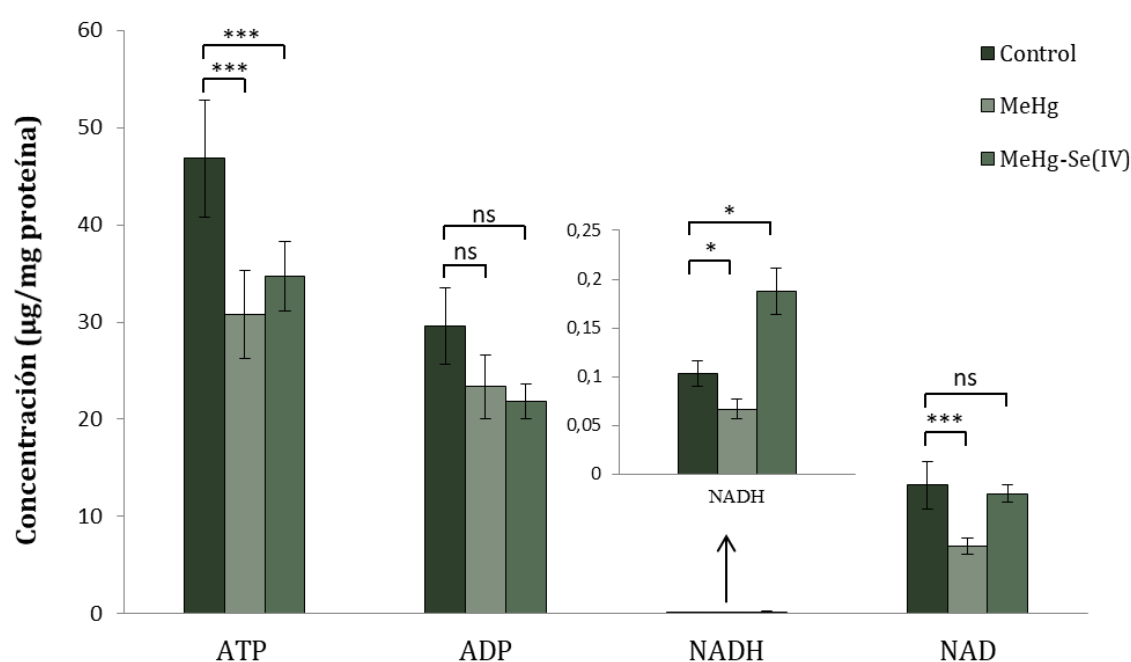


Figura 30. Niveles de los cuatro metabolitos cuantificados mediante metabolómica dirigida. Los datos se evaluaron mediante ANOVA y posterior test de Bonferroni. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; ns, no significativo ($n = 5$).

II. 2 Discusión

Los diferentes experimentos llevados a cabo, han puesto de manifiesto que la toxicidad inducida por el MeHg se refleja en la falta de ATP, la generación de ROS, la aparición de procesos inflamatorios y en la activación del ciclo de la urea. Este mecanismo, que se representa en la **Figura 31**, se discute detalladamente a continuación:

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la exposición a Hg^{2+} y MeHg induce la inhibición del complejo ATP sintasa [40,209]. Este hecho incide directamente en la viabilidad celular, ya que esta enzima es uno de los pilares fundamentales para la síntesis del ATP celular. Además, la proteína encargada de utilizar este ATP para obtener energía, denominada ATPasa, también se encontró inhibida en diferentes estudios por efecto del MeHg [40,209,210]. Nuestros estudios de metabolómica dirigida confirman la disminución significativa de los niveles de ATP en células expuestas exclusivamente a MeHg, hecho observado previamente [211], y que demuestra el problema con la síntesis del mismo. En cuanto a los niveles de ADP, se encontró que disminuyen por efecto de la exposición a MeHg, pero no de forma significativa. Por una parte, cabría esperar que a menores niveles de ATP, también existieran menores niveles de ADP. No obstante, estudios previos de proteómica han demostrado que el MeHg no afecta al mecanismo de síntesis del ADP, ya que no ejerce ningún efecto sobre la expresión de la translocasa de nucleótidos de adenina, principal enzima relacionada con dicho mecanismo [40], lo que da coherencia a los resultados obtenidos a nivel del metabolito.

La carencia de ATP observada en células expuestas a MeHg induce la activación de rutas metabólicas, entre las que se encuentra la activación del ciclo de Krebs, que les permitan obtener el sustento energético necesario para preservar las funciones vitales [202]. El ácido propanoico ($R_M = 2,59$), que se encontró en concentraciones superiores por efecto del MeHg en el experimento de metabolómica no dirigida, puede comportarse como sustrato de la glicólisis, en un intento de la célula de activar esta ruta probablemente inhibida por el MeHg. Este ácido se convierte en propionil-CoA, y participa en el ciclo de Krebs como succinil-CoA, permitiendo así aumentar la concentración de oxalacetato, el cual se transforma mayoritariamente en glucosa

[212]. Por otro lado, la glutamina ($R_M = 3,26$) es uno de los aminoácidos con mayor carácter gluconeogénico y es activada en casos de demanda de energía, especialmente en el cerebro. Este metabolito es directamente un precursor de un metabolito intermedio del ciclo de Krebs, el α -ketoglutarato [213–215]. Además, la isoleucina ($R_M = 2,01$) es un aminoácido que se cataboliza y ofrece una ruta alternativa a la glicólisis, permitiendo la obtención de acetil-CoA, el cual también es indispensable en el ciclo de Krebs [216]. Los niveles de estos dos aminoácidos, glutamina e isoleucina, resultaron aumentados en células Neuro-2a, tras la exposición a MeHg, lo que está de acuerdo con la activación de rutas metabólicas alternativas que proporcionen energía a células deficientes en ATP.

Por su parte, la glucosa ($R_M = 1,57$) se presentó en concentraciones superiores tras la exposición a MeHg respecto al control. Este hecho se traduce en su acumulación en el interior celular probablemente debido a una inhibición de la ruta glicolítica [217], o concretamente a la inhibición de enzimas involucradas en el proceso de la glicólisis, especialmente aquellas que presentan grupos tiol como la fosfoglicerato mutasa, enolasa y piruvato kinasa. Estas proteínas se vieron inhibidas por efecto del MeHg en uno de los pocos estudios de proteómica realizados por otro grupo de investigación y que está directamente relacionado con la alteración de esta ruta metabólica [218]. Otro indicador de que la exposición a MeHg inhibe la glicólisis, fueron los bajos niveles de alanina ($R_M = 0,72$) encontrados en células expuestas a MeHg. La alanina juega un papel fundamental en la prevención de la inhibición de la proteína piruvato kinasa por la acción de algún agente externo y, en consecuencia, de la ruta glicolítica [219].

Otros metabolitos pertenecientes al ciclo de Krebs como el ácido málico (malato) ($R_M = 1,47$), el isocítrico (citrato) ($R_M = 1,34$) y el fumárico o 2-butenedioico (fumarato) ($R_M = 1,98$) también aparecieron a mayor concentración en células expuestas a MeHg. Como se ha mencionado anteriormente, el aumento de concentración de estos metabolitos es coherente con el hecho de que las células activen mecanismos alternativos para mantener los niveles de energía en condiciones basales [202]. Además, se sabe que niveles elevados de ATP y NADH inhiben esta ruta metabólica [220]. Por tanto, dado que los niveles de estos dos metabolitos se encontraron negativamente afectados tras la exposición a MeHg, adquiere mayor sentido el hecho

de que la activación del ciclo de Krebs sea la principal ruta metabólica alternativa en células expuestas a este tóxico para regular su metabolismo energético.

Por otra parte, la reducción significativa de los niveles de NADH y NAD⁺ por efecto del MeHg se ha reportado en estudios previos [209]. Esto se debe a que el MeHg afecta a la cadena de transporte electrónico en sus distintos niveles: I, II y III. La inhibición del complejo III supone la disminución de la actividad del complejo I en un 75%, como resultado, la conversión de NADH a NAD⁺ puede verse notablemente afectada. Por otro lado, la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa en las células neuronales puede verse también inhibida debido a la ausencia de su cofactor NAD⁺ por acción del MeHg. Este hecho supone la acumulación de un metabolito intermedio tóxico conocido como 3,4-dihidroxifenilaldehído, que es una especie reactiva asociada con la degradación de proteínas y ADN, así como con la inducción de muerte celular [209].

Los resultados derivados de nuestro estudio han demostrado que la toxicidad del MeHg no sólo afectó al metabolismo energético, sino que ocasionó diferentes tipos de estrés como el oxidativo y el inflamatorio. Esto se reflejó en la síntesis enzimática de prolina ($R_M = 0,22$), por ejemplo, la cual se encontró en concentraciones inferiores en células expuestas a MeHg respecto a células control. La prolina es inhibida por la ornitina ($R_M = 3,88$), que presentó concentraciones más elevadas tras la exposición a MeHg. La deficiencia de prolina puede afectar a la síntesis proteica pero sobre todo a rutas que regulan el estado redox y el metabolismo energético [221]. Además, también se detectaron niveles superiores de ácido aminomalónico ($R_M = 2,36$) en células expuestas a MeHg. Este hecho se ha asociado con la oxidación mediada por radicales libres de residuos de aminoácidos de proteínas, principalmente glicina y cisteína, y se ha relacionado con el estrés inflamatorio y/o oxidativo en enfermedades como las cardiovasculares [222]. Finalmente, ácidos grasos saturados tales como el ácido hexadecanoico ($R_M = 1,85$) y el ácido octadecanoico ($R_M = 1,60$), que aparecieron en concentraciones superiores tras la exposición a MeHg, también se han relacionado con la inducción de procesos celulares inflamatorios y, en consecuencia, con efectos neurológicos adversos [223].

Asimismo, nuestros resultados también han mostrado la activación de mecanismos de defensa en células expuestas a MeHg a través de dos vías: la antiinflamatoria y la que combate el estrés oxidativo. En la respuesta antiinflamatoria adquiere especial importancia el metabolito hentriacontano ($R_M = 1,94$), que se comporta como regulador de los mediadores de la inflamación mediante la inhibición de los lipopolisacáridos [224]. Este metabolito se encontró en niveles superiores en nuestro experimento tras la exposición a MeHg, lo que refleja un aumento de la activación de los mecanismos antiinflamatorios en células expuestas a MeHg. Por otra parte, en el caso del ácido vaccénico, también conocido como ácido 11-cis-octadecenoico ($R_M = 1,60$), apareció en niveles superiores en células expuestas a MeHg respecto a células control, siendo éste un metabolito que se biotransforma directamente en ácido linoleico. El ácido linoleico posee una elevada actividad antioxidante, habiéndosele incluso atribuido efecto anticancerígeno y antiaterogénico [225].

Aunque se ha mencionado anteriormente que la glutamina ($R_M = 3,26$) se utiliza como fuente de energía, cantidades anormalmente elevadas de la misma, como las que se observaron tras la exposición a MeHg, pueden ser tóxicas y desencadenar una serie de eventos perjudiciales, especialmente en células neuronales. Entre estos eventos destacan, principalmente, el daño mitocondrial, la generación de radicales libres y, lo que puede resultar crítico para una célula u organismo, la formación de amoníaco [215]. La eliminación de amoníaco y amonio a nivel celular se realiza a partir del ciclo de la urea. El nitrógeno en exceso, en forma de amoníaco, junto con el exceso de aspartato ($R_M = 3,67$), que también se encontró en concentraciones superiores en células expuestas a MeHg, son los sustratos que se incorporan en este ciclo para la obtención de urea ($R_M = 1,70$) [226]. Este proceso se realiza en el hígado, cerebro, músculos y riñón. La sobreexpresión de este ciclo, inducida por el efecto tóxico del MeHg, se confirmó debido a que la propia urea apareció en concentraciones significativamente superiores al control. Pero también, a que otros metabolitos identificados y estudiados como la ornitina ($R_M = 3,88$) [227] y el ácido 2-butenedioico o ácido fumárico (fumarato) ($R_M = 1,98$), ambos productos intermedios de este ciclo, presentaron niveles superiores [228]. La activación de este ciclo no se ha relacionado antes con la toxicidad del MeHg, sin embargo, sí se ha encontrado relación entre altos niveles de urea y enfermedades neuronales, lo cual está de acuerdo con el conocido

efecto neurotóxico del MeHg [228]. Además, este tipo de alteración del ciclo de la urea ha sido directamente relacionada con la inducción de la proliferación de células tumorales [226], lo que podría contribuir a resolver la controversia existente en relación al potencial poder carcinogénico del MeHg [226,229].

En cuanto a la co-administración de MeHg y Se (IV), en general y en base a los resultados obtenidos en nuestro estudio, puede decirse que la acción del Se(IV) conlleva una mejora respecto a la desestabilización energética observada en células tratadas únicamente con MeHg. El efecto protector del Se(IV) frente a la toxicidad con MeHg ya se vio reflejado en el hecho de que células expuestas a 10 μM de MeHg y cantidades equivalentes en μM de Se(IV), sobrevivieron el doble de tiempo que las que sólo estuvieron expuestas a MeHg.

Además, el estudio de metabolómica no dirigida ha reflejado que la glucosa en este caso no se acumuló en células tratadas con MeHg y Se(IV), ya que no se encontraron concentraciones significativamente más altas, por lo que puede afirmarse que la inhibición de las enzimas glicolíticas afectadas por el MeHg, se ve atenuada o neutralizada por efecto del Se(IV). Los beneficios del Se(IV) también se observaron en el metabolismo energético. Tras los estudios de metabolómica dirigida se aumentó la concentración de ATP en la célula, a pesar de que la diferencia con respecto al nivel de ATP en las muestras control siguió siendo significativa, lo que pone de manifiesto que el efecto negativo del MeHg no es completamente neutralizado por el Se(IV). El efecto protector del Se(IV) también se demuestra en el hecho de que las concentraciones de NAD^+ y NADH se restablecieron y equipararon con el control e, incluso, superaron significativamente al control en el caso del NADH. Lo que demuestra que se consiguió mejorar el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Por otro lado, al fijarnos en el ciclo de Krebs, algunos metabolitos pertenecientes al mismo, como el malato y el isocitrato, que aparecían a niveles más altos en células tratadas únicamente con MeHg, también recuperaron sus concentraciones basales al ser tratados con Se(IV).

Otros efectos tóxicos inducidos por el MeHg como los posibles efectos inflamatorios y neurológicos anteriormente citados, también se redujeron tras la co-administración de

Se(IV), al igual que los niveles de los ácidos grasos. Sin embargo, al no estar acumulada la glucosa, la cual se emplea, prácticamente en su totalidad, en la síntesis de ATP, resulta necesaria la presencia de otras moléculas que sean fuente de síntesis de ácidos grasos saturados e insaturados. En este sentido el glicerol ($R_M = 0,68$) se encontró en concentraciones significativamente más bajas en células expuestas a MeHg-Se(IV), lo cual puede explicarse ya que este metabolito es un excelente sustrato para la síntesis de ácidos grasos, por lo que su reducción en células tratadas con MeHg-Se(IV) podría deberse a estar utilizándose en el mecanismos de síntesis de ácidos grasos con el fin de mantener los niveles adecuados de los mismos [230].

Por otro lado, el efecto protector del Se(IV) se puede relacionar con el aumento significativo que se observó en la concentración de prolina ($R_M = 2,26$). Se ha visto que la concentración de esta especie aumenta en respuesta al estrés oxidativo celular, esto es debido a su capacidad para neutralizar radicales libres. Además, la prolina es el mejor sustrato para la síntesis de poliaminas que regulan la expresión génica y diversas rutas de señalización celular. Esto se traduce en una serie de efectos beneficiosos para la salud, como el mantenimiento y reparación del intestino, la inhibición de procesos inflamatorios, la mejora de la función mitocondrial, el aumento de la actividad antioxidante e incluso el tratamiento de enfermedades neurológicas [231,232]. Esta relación cooperativa entre el Se(IV) y las poliaminas ya fue descrita previamente por Thompson *et al.* [233].

A pesar de que los resultados comentados anteriormente demuestran el efecto protector del Se(IV), que consigue por una parte paliar varios de los mecanismos de toxicidad inducidos por la exposición a MeHg y, por otra, reforzar los mecanismos de defensa celulares, no todos los mecanismos de toxicidad observados en células expuestas a MeHg se desactivaron por efecto del Se(IV) en las condiciones experimentales evaluadas. Esto se vio reflejado en los metabolitos relacionados con el ciclo de la urea, como la glutamina ($R_M = 2,86$), la ornitina ($R_M = 2,81$) y la propia urea ($R_M = 1,97$), cuyos niveles no se restauraron tras la co-administración de Se(IV), si bien sí, en el caso de los dos primeros metabolitos, disminuyeron.

En base a todos los resultados comentados anteriormente, se puede concluir que la exposición a MeHg de células Neuro-2a induce la alteración de determinados metabolitos que confirman, por una parte, la inhibición de rutas metabólicas que se utilizan para la obtención de energía como la glicólisis o la cadena respiratoria y, por otra, la activación de rutas alternativas que permiten a la célula obtener energía, en concreto el ciclo de Krebs. Además, también se ha demostrado, por primera vez, la alteración del ciclo de la urea, directamente relacionado con la actividad neurotóxica del MeHg y con su potencial efecto carcinogénico.

Asimismo, los resultados han puesto de manifiesto la acción protectora del Se(IV), cuya co-administración permite recuperar los niveles basales de la mayor parte de metabolitos alterados tras la exposición a MeHg. Cabe destacar la recuperación de prácticamente todas las rutas metabólicas relacionadas con la obtención de energía, e incluso de los niveles de los propios metabolitos energéticos, así como de algunas que originan el efecto tóxico o inflamatorio. Además, se ha demostrado que la co-administración de Se(IV) favorece la activación de mecanismos de defensa antioxidantes y de detoxificación.

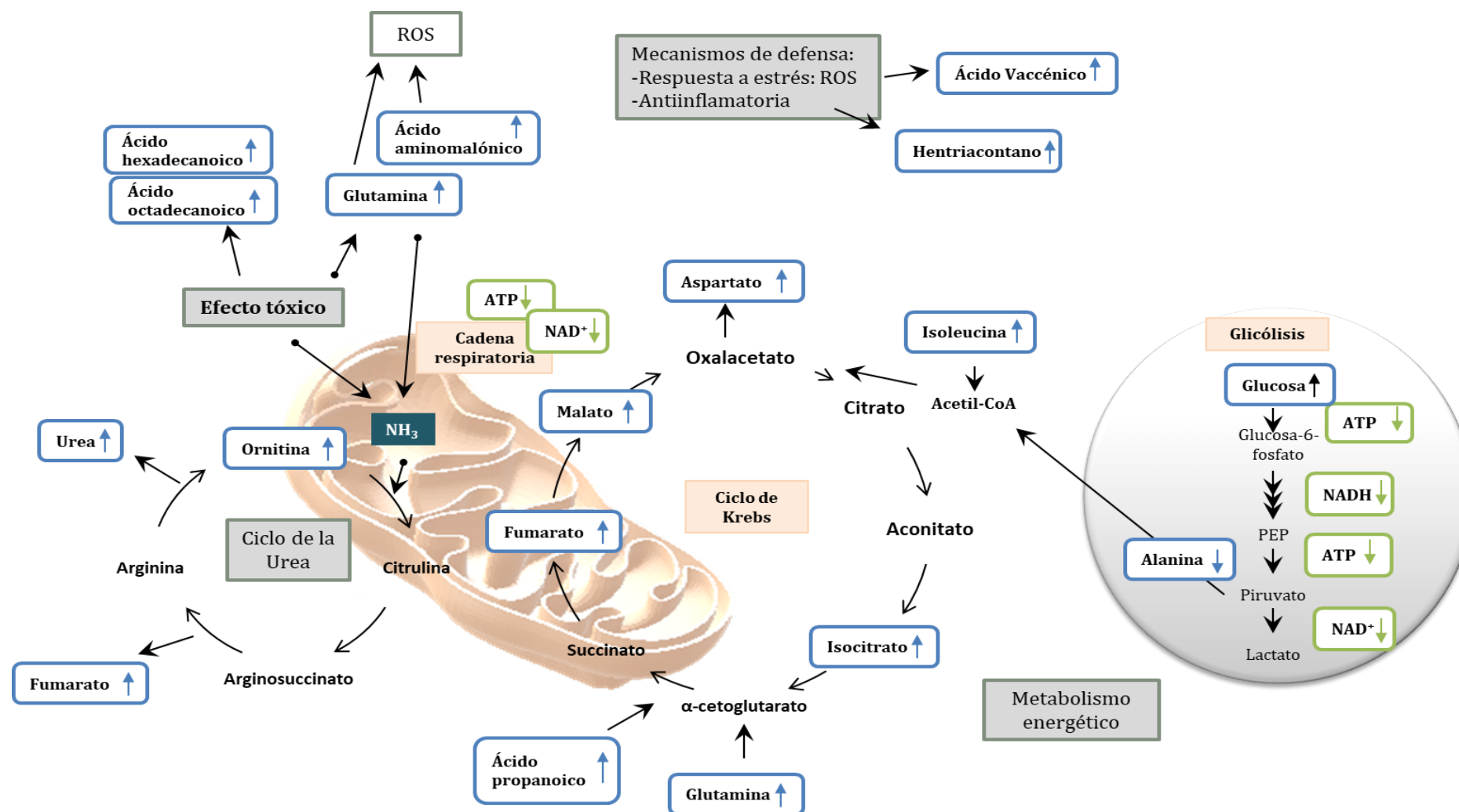


Figura 31. Principales rutas metabólicas asociadas con el mecanismo de toxicidad del MeHg deducido mediante técnicas de metabolómica no dirigida (azul) y dirigida (verde).

III. ESTUDIOS DE TOXICIDAD DEL SURFYNOL

III. 1 Resultados

En este capítulo se seleccionó un tensioactivo, el 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol (TMDD), conocido como Surfynol, y del cual se desconoce su toxicidad a pesar de ser ampliamente utilizado en el envasado de alimentos, razón por la cual se puede considerar un nuevo potencial contaminante emergente.

III. 1. a Estudios previos

Estudios de migración previos empleando envases alimentarios en los que se había utilizado Surfynol como adhesivo, realizados en el laboratorio de la Prof^a Nerín de la Universidad de Zaragoza, pusieron de manifiesto que el Surfynol, como un conjunto de varias moléculas de TMDD etoxiladas, estaba presente en el simulante alimentario empleado en dichos estudios, y que las concentraciones halladas eran muy superiores a los límites de seguridad establecidos por el umbral de alarma toxicológico de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (**Figura 32**). Además, la migración del tensioactivo persistió a pesar de disminuir el tamaño de poro de las capas del empaquetado.

Por otra parte, al emplear bolsas de almacenamiento para esperma, que igualmente contenían Surfynol como adhesivo entre las diferentes capas del empaquetado, y tras evaluar la motilidad, la integridad del acrosoma, la actividad mitocondrial y la capacidad de penetración de los espermatozoides contenidos en las mismas, se observó que, aunque la viabilidad de los espermatozoides no se vio realmente afectada, la motilidad de dichos espermatozoides disminuyó progresivamente con el aumento de la concentración de Surfynol. Del mismo modo se comprobó que la actividad mitocondrial, la reactividad del acrosoma y la capacidad de penetración del esperma decrecieron significativamente. Todas estas funciones alteradas suponen un efecto negativo sobre la calidad de los espermatozoides desde un punto de vista de fertilidad.

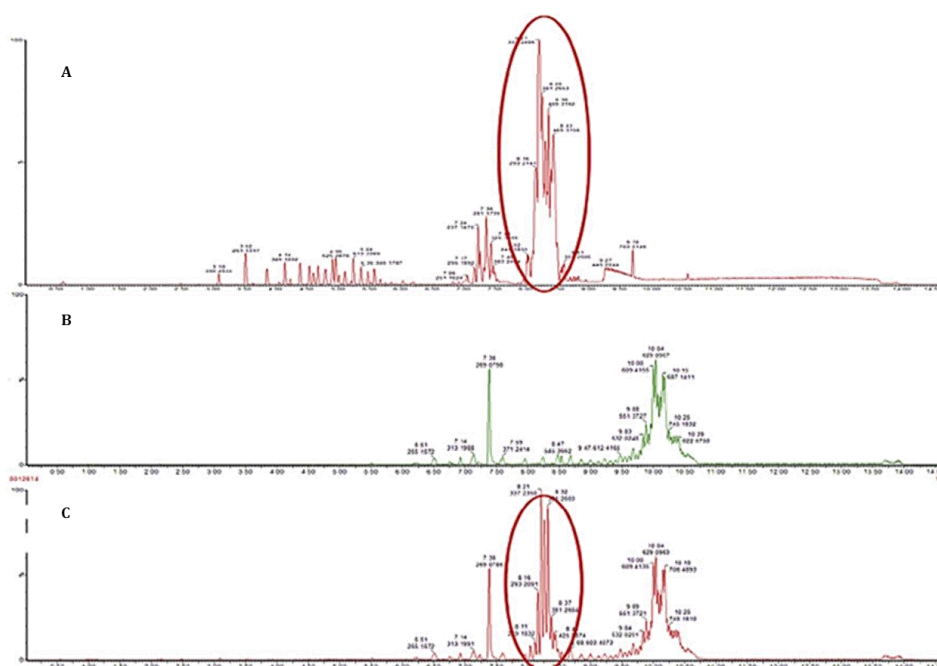


Figura 32. Análisis mediante UPLC-MS-Q-TOF que demuestra la migración del Surfynol a través del envase: A, cromatograma del Surfynol, B, blanco de migración con ácido acético al 3% como simulante alimentario. C, cromatograma del mismo simulante alimentario, pero con un envase multicapa que contiene Surfynol.

En base a estos dos hechos se decidió llevar a cabo un estudio durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral con objeto de profundizar en el conocimiento relacionado con la toxicidad del Surfynol y, concretamente, en los mecanismos a nivel molecular responsables de dicho efecto tóxico, tanto a nivel de proteínas como de metabolismo.

III. 1. b Estudio de viabilidad celular

Se realizó el ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad del Surfynol en la línea celular NTERA2. Se seleccionó esta línea ya que se trata de células germinales de carcinoma embrionario testicular, las cuales al diferenciarse dan lugar a los espermatozoides. Los resultados del ensayo ($n = 5$) se representan en la **Figura 33**. Se observó un decrecimiento del 85 al 5% de viabilidad al aumentar las concentraciones de Surfynol desde 1 a 50 mg/L, respectivamente. Esta última concentración originó la muerte de

prácticamente todas las células germinales, demostrando así la citotoxicidad relacionada con este tensioactivo. A la vista de estos resultados, se seleccionaron como condiciones de exposición para futuros estudios 20 mg/L y 72 h, al tratarse de condiciones a las cuales existe una disminución de la viabilidad celular de aproximadamente el 50%, permaneciendo viables un número suficiente de células que permitió así evaluar los mecanismos de toxicidad sin que el modelo estuviese altamente comprometido.

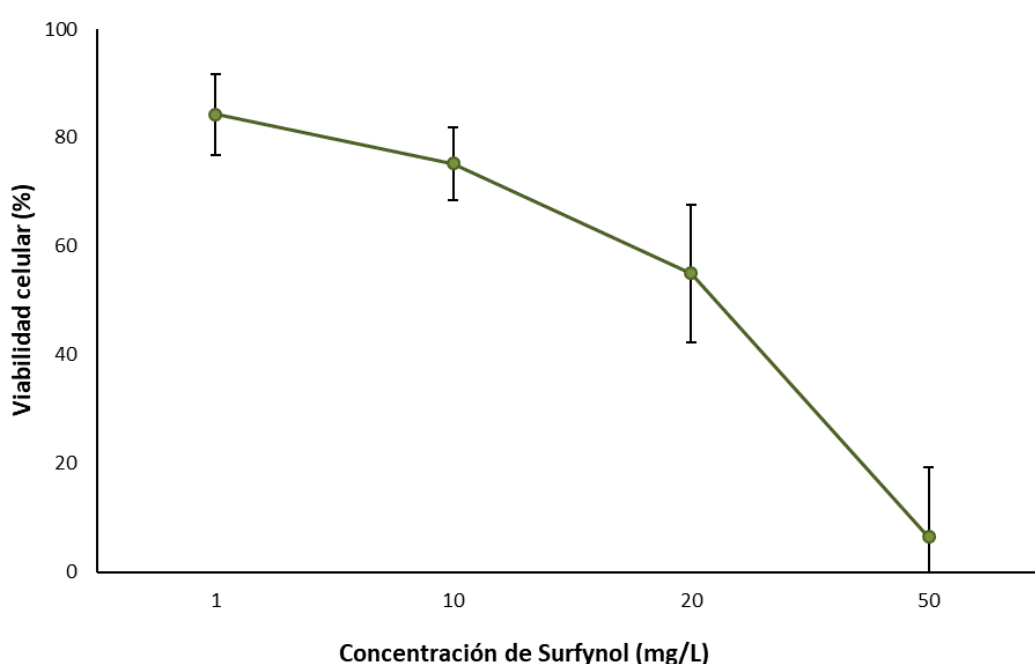


Figura 33. Representación de la disminución de la viabilidad de las células germinales NTERA2 con el aumento de la concentración de Surfynol ($n = 5$).

III. 1. c Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en células NTERA2 expuestas a Surfynol

La identificación de proteínas diferencialmente expresadas tras la exposición de células NTERA2 a 20 mg/L de Surfynol se llevó a cabo mediante la estrategia de proteómica cuantitativa SILAC. El experimento se realizó por duplicado y se

identificaron un total de 2207 proteínas comunes a los dos experimentos. Las identificaciones se llevaron a cabo con un nivel de confianza del 99% ($p < 0,01$). Se estableció como criterio que todas las proteínas consideradas válidas se hubieran identificado con al menos dos péptidos únicos, es decir, dos péptidos que no se compartieran por ninguna otra proteína. De las proteínas identificadas, 1147 pasaron los criterios de cuantificación que establecen un Mascot score superior a 47 para cada proteína identificada ($p < 0,01$), y superior a 40 para los péptidos que las conforman ($p < 0,05$). Además, estas proteínas debían haber sido identificadas en las dos réplicas y poseer una desviación estándar relativa asociada al valor de cuantificación R_{SILAC} inferior al 20%. Se consideraron desreguladas, proteínas que mostraron un R_{SILAC} superior a 1,50 o inferior a -1,50. Con este criterio, de las 1147 proteínas cuantificadas se encontraron alteradas un total de 108 proteínas, de las cuales 74 se encontraron inhibidas (**Tabla 13**) y 34 sobreexpresadas (**Tabla 14**). En las tablas se incluye el número de identificación GI, el R_{SILAC} para cada proteína, el Mascot score y la desviación estándar relativa (%RSD). Como cabía esperar en un experimento de este tipo, la mayoría de las proteínas cuantificadas mostraron un R_{SILAC} cercano a 1, lo que indica que la mayor parte de proteínas no se ven alteradas tras la exposición a Surfynol en las condiciones evaluadas.

Tabla 13. Proteínas inhibidas en células NTERA2 expuestas a 20 mg/L de Surfynol durante 72h.

Número GI	Nombre de la proteína	R_{SILAC}	Mascot score	SILAC RSD (%)
4502101	annexin A1	-4,61	951	17,51
4506761	protein S100-A10	-4,03	139	6,11
4506749	ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	-2,93	105	17,36
5032057	protein S100-A11	-2,74	256	16,40
383792150	lamin isoform D	-2,73	328	19,87
4557839	phosphomannomutase 2	-2,72	65	5,27
5031875	lamin isoform C	-2,62	228	18,62

Número GI	Nombre de la proteína	R _{SILAC}	Mascot score	SILAC RSD (%)
333033787	nascent polypeptide-associated complex subunit alpha isoform a	-2,61	600	17,36
48255905	transgelin	-2,60	729	18,38
5174387	prominin-1 isoform 1 precursor	-2,47	126	18,80
4757756	annexin A2 isoform 2	-2,43	935	19,90
10190670	growth/differentiation factor 3 precursor	-2,38	218	8,26
116805322	filamin-C isoform a	-2,37	1111	18,89
13994151	PDZ and LIM domain protein 1	-2,36	134	16,25
44680105	caldesmon isoform 1	-2,31	227	19,08
63252896	tropomyosin alpha-1 chain isoform 3	-2,28	270	17,76
188497756	ubiquitin-associated protein 2-like isoform b	-2,20	202	6,82
62460637	importin-4	-2,17	188	19,65
4508047	Zyxin	-2,13	67	18,70
27477070	TATA-binding protein associated factor 172	-2,09	144	2,77
164698502	septin-9 isoform d	-2,09	97	8,83
11128019	cytochrome c	-2,04	122	17,62
164664518	probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	-2,00	58	7,86
33457348	UPF0556 protein C19orf10 precursor	-1,95	103	4,14
5031571	actin-related protein 2 isoform b	-1,95	94	36,31
260099723	L-lactate dehydrogenase A chain isoform 3	-1,94	309	17,29
5031857	L-lactate dehydrogenase A chain isoform 1	-1,94	298	18,53
17017988	cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial precursor	-1,93	91	18,71
41406084	glutathione peroxidase 1 isoform 1	-1,90	139	17,96
32483399	serine/threonine-protein kinase PAK 2	-1,89	111	10,81
21264341	spermine synthase isoform 1	-1,88	191	7,04

Número GI	Nombre de la proteína	R _{SILAC}	Mascot score	SILAC RSD (%)
27436946	lamin isoform A	-1,88	344	17,92
4507357	transgelin-2	-1,88	1611	18,17
13129092	transmembrane protein 109 precursor	-1,86	154	2,73
4759188	syntaxin-8	-1,84	122	18,31
6912734	transportin-3 isoform 1	-1,83	129	13,34
33350932	cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	-1,82	191	19,21
251831110	cytochrome c oxidase subunit II	-1,82	318	17,00
10863903	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	-1,82	64	19,75
4504035	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	-1,81	277	2,84
62414289	vimentin	-1,79	4340	19,14
4758484	glutathione S-transferase omega-1 isoform 1	-1,79	66	11,74
4757766	rho GTPase-activating protein 1	-1,76	183	10,96
332164775	pyruvate kinase isozymes M1/M2 isoform c	-1,75	126	14,71
28827795	charged multivesicular body protein 4b	-1,74	204	5,51
55770844	catenin alpha-1	-1,73	251	16,71
4826649	39S ribosomal protein L49, mitochondrial	-1,69	202	10,72
4758988	ras-related protein Rab-1A isoform 1	-1,69	278	14,58
6041669	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4 isoform 1	-1,66	145	13,32
7706367	DNA replication complex GINS protein PSF2	-1,64	75	9,09
4506929	endophilin-A2 isoform 1	-1,64	165	16,55
33286418	pyruvate kinase isozymes M1/M2 isoform a	-1,64	522	18,15
4758714	microsomal glutathione S-transferase 3	-1,64	282	18,09
13654278	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial isoform 1	-1,63	149	5,85
6912638	ras suppressor protein 1 isoform 1	-1,62	89	10,22

Número GI	Nombre de la proteína	R _{SILAC}	Mascot score	SILAC RSD (%)
4507115	Fascin	-1,62	98	4,70
4507813	UDP-glucose 6-dehydrogenase isoform 1	-1,62	157	1,51
13569870	ubiquitin-related modifier 1 homolog isoform a	-1,60	102	19,56
188497750	hexokinase-1 isoform HKI-td	-1,60	325	13,66
19923951	protein C10	-1,59	334	16,46
42542379	serine/arginine repetitive matrix protein 1	-1,59	130	4,95
5579478	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	-1,57	136	17,24
190885499	cytochrome c oxidase subunii, 5A, mitochondrial precursor	-1,57	249	16,93
4504517	heat shock protein beta-1	-1,57	368	19,53
5174391	alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	-1,57	145	3,48
116256489	septin-9 isoform c	-1,56	112	8,67
22538444	quinone oxidoreductase PIG3 isoform 1	-1,56	83	6,79
4507751	thymidylate synthase	-1,54	160	9,98
14210536	tubulin beta-6 chain	-1,54	1689	10,35
5454088	acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	-1,53	337	18,74
5730023	ruvB-like 2	-1,53	310	4,39
223029410	talin-1	-1,53	1920	19,03
71773329	annexin A6 isoform 1	-1,52	468	19,30
15618997	glutathione peroxidase 7 precursor	-1,51	92	9,23

Tabla 14. Proteínas sobreexpresadas en células NTERA2 expuestas a 20 mg/L de Surfynol durante 72h.

Número GI	Nombre de la proteína	R _{SILAC}	Mascot score	SILAC RSD (%)
4758328	fatty acid-binding protein, heart	1,51	223	3,10
8923920	core histone macro-H2A.2	1,52	156	18,79

Número GI	Nombre de la proteína	R _{SILAC}	Mascot score	SILAC RSD (%)
62530384	enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial isoform 1 precursor	1,52	86	8,35
155722983	heat shock protein 75 kDa, mitochondrial precursor	1,53	416	18,33
5174529	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	1,53	246	1,08
83641870	nucleophosmin isoform 3	1,53	99	16,05
7106299	ataxin-10 isoform 1	1,53	124	0,48
4758516	hepatoma-derived growth factor isoform a	1,54	726	18,44
4503453	endothelial differentiation-related factor 1 isoform alpha	1,54	168	9,87
21536286	creatine kinase B-type	1,54	410	15,17
21536320	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 isoform d	1,57	154	18,34
17402893	phosphoserine aminotransferase isoform 1	1,58	454	14,36
4503727	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	1,58	110	8,29
4503051	dihydropyrimidinase-related protein 1 isoform 2	1,60	310	15,34
120433593	acyl-CoA-binding protein isoform 2	1,61	159	8,24
296531406	ES1 protein homolog, mitochondrial isoform la precursor	1,61	61	5,72
4507801	small ubiquitin-related modifier 1 isoform a precursor	1,61	59	10,74
56847620	transcription factor BTF3 homolog 4 isoform 1	1,62	96	18,78
21361278	alpha-globin transcription factor CP2 isoform 1	1,63	168	4,62
28882049	replication factor C subunit 2 isoform 2	1,68	225	8,77
4503291	D-dopachrome decarboxylase	1,70	111	19,90
48928056	heat shock 70 kDa protein 13 precursor	1,78	64	2,37
31563534	replication factor C subunit 2 isoform 1	1,84	277	5,31
23111038	sorting nexin-2	1,90	60	15,95
6005719	probable ergosterol biosynthetic protein 28	2,00	102	13,74
319655561	alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase isoform 2	2,09	309	13,41

Número GI	Nombre de la proteína	R _{SILAC}	Mascot score	SILAC RSD (%)
7662238	apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus isoform 1	2,10	56	19,72
148612885	ADP-ribosylation factor-like protein 2 isoform 1	2,22	67	15,97
4503379	dihydropyrimidinase-related protein 3 isoform 2	2,23	407	19,12
4503029	cellular retinoic acid-binding protein 2	2,42	98	14,98
25470886	DAZ-associated protein 1 isoform b	2,47	141	10,98
4759098	transformer-2 protein homolog beta isoform 1	3,26	75	14,37
7657603	heme-binding protein 2	4,00	87	3,14
4504251	histone H2A type 2-A	4,08	827	1,85

Las proteínas diferencialmente expresadas, se agruparon en función de los procesos biológicos en los que intervienen empleando la base de datos Gene Ontology (*Figura 34*).

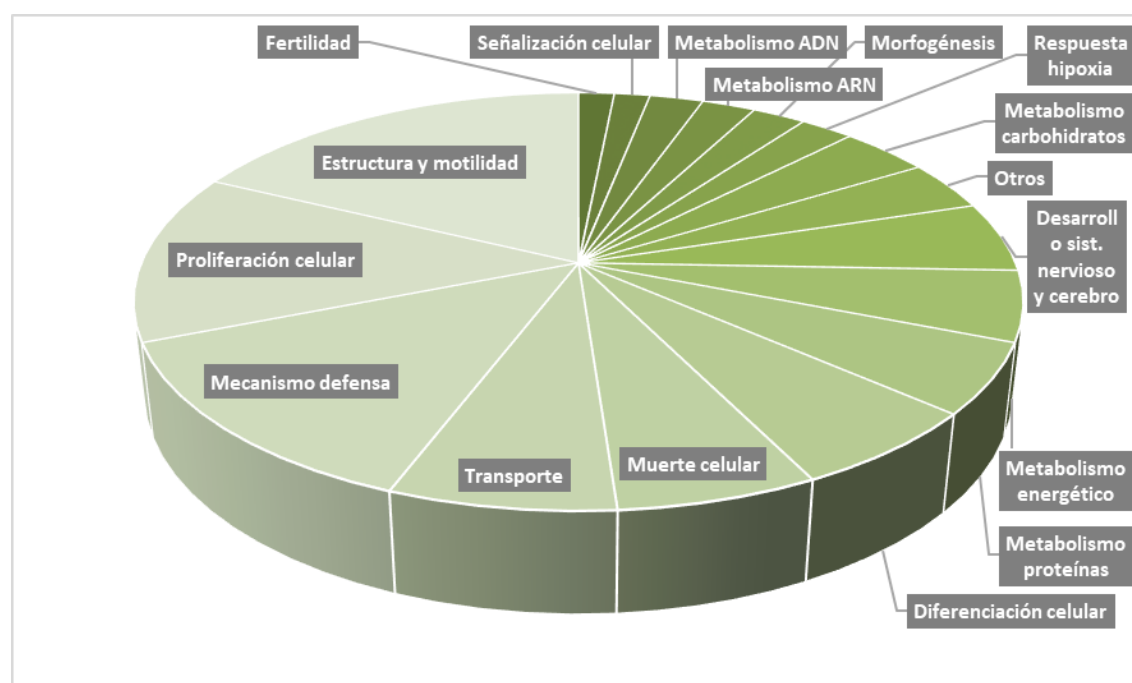


Figura 34. Principales procesos biológicos en los que están implicados las proteínas alteradas por efecto del Surfynol en células NTERA2. La información se ha obtenido de la base de datos GO.

Se puede concluir que la exposición a Surfynol afecta principalmente a proteínas implicadas en el mantenimiento de la estructura y la motilidad, la proliferación y diferenciación celular, mecanismos de defensa, el transporte celular y la muerte celular. Una discusión más extensa de estos resultados se ha llevado a cabo en una sección posterior y de forma conjunta a las alteraciones encontradas a nivel de metabolitos.

III. 1. d Metabolómica no dirigida

Se realizaron estudios de metabolómica no dirigida para complementar los estudios de proteómica realizados. Para ello, se empleó el método de extracción de metabolitos de cultivo celular optimizado en el capítulo anterior (sección II.1.a). Tras los análisis realizados mediante GC-MS ($n = 7$), se identificaron un total de 45 metabolitos comunes entre controles y muestras tratadas con Surfynol. En la **Figura 35** se muestra a modo de ejemplo un cromatograma representativo de todos los metabolitos identificados en estos análisis.

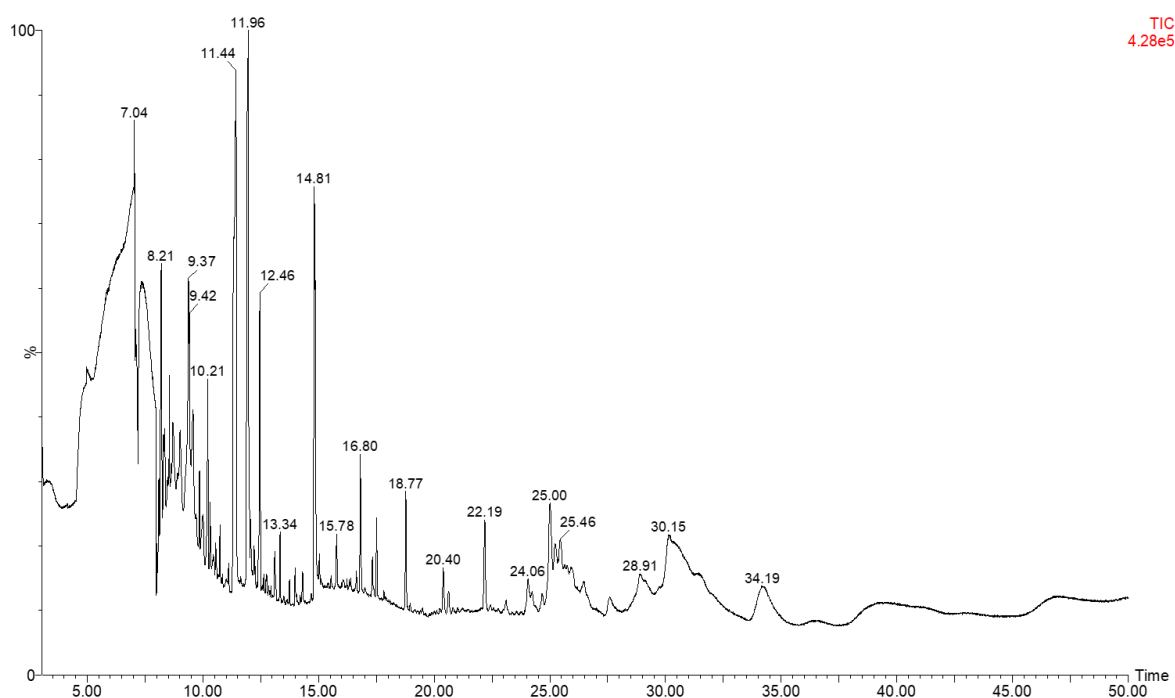


Figura 35. Cromatograma total de los metabolitos obtenidos mediante metabolómica no dirigida de las células NTERA2.

Para asegurar la fiabilidad de la identificación se consideró un valor mínimo NIST Rmatch de 700, consiguiendo la correcta identificación de metabolitos de diferente naturaleza: aminoácidos, ácidos grasos, azúcares, ácidos orgánicos y pequeñas moléculas. Además, el patrón interno se identificó inequívocamente y se cuantificó en todas las muestras, empleándose para normalizar el área del resto de metabolitos y corregir fluctuaciones debidas a la etapa de derivatización de las muestras o a la inyección y análisis de las mismas.

Con los promedios de las áreas normalizadas de estos metabolitos correctamente identificados en al menos la mitad de las réplicas, se llevó a cabo el estudio estadístico de la t-Student ($p < 0,05$) que permitió encontrar diferencias significativas entre los niveles de los metabolitos de células control y células expuestas a Surfynol. De todos estos metabolitos identificados, un total de 10 aparecieron alterados tras el análisis estadístico. Se puede observar en las **Tablas 15 y 16** que 5 de los metabolitos alterados presentaron niveles superiores, y 5 inferiores en células expuestas a Surfynol con respecto al control. Además, en las tablas se indica el tiempo de retención cromatográfico en minutos y el Rmatch obtenido de la librería NIST que certifica la correcta identificación de cada uno de los analitos.

Tabla 15. Metabolitos cuya concentración se ve aumentada significativamente en células NTERA2 por efecto del Surfynol (20 mg/L).

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	NIST Rmatch	R _M (Área Surfynol/Área control)
Glutamine	22,127	884	2,69
L-Threonine	17,285	898	2,44
Propanoic acid	10,241	918	2,33
Octadecanoic acid	35,088	894	1,79
Carbamic acid	16,773	726	1,56

Tabla 16. Metabolitos cuya concentración se ve disminuida significativamente en células NTERA2 por efecto del Surfynol (20 mg/L).

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	NIST Rmatch	R _M (Área Surfynol/Área control)
L-Valine	10,577	917	0,08
Oxalic acid	10,324	743	0,28
Phosphoric acid	12,732	834	0,76
Phenylalanine	20,685	846	0,76
Myoinositol	30,789	866	0,78

La **Figura 36** muestra la red de metabolitos alterados (en azul) en la especie *Homo sapiens* y sus proteínas asociadas (en rojo). Como se puede observar, todos los metabolitos parecen estar conectados especialmente a través del fosfato y la glutamina, lo que sugiere que podrían ser los puntos clave en la vía de la toxicidad del Surfynol.

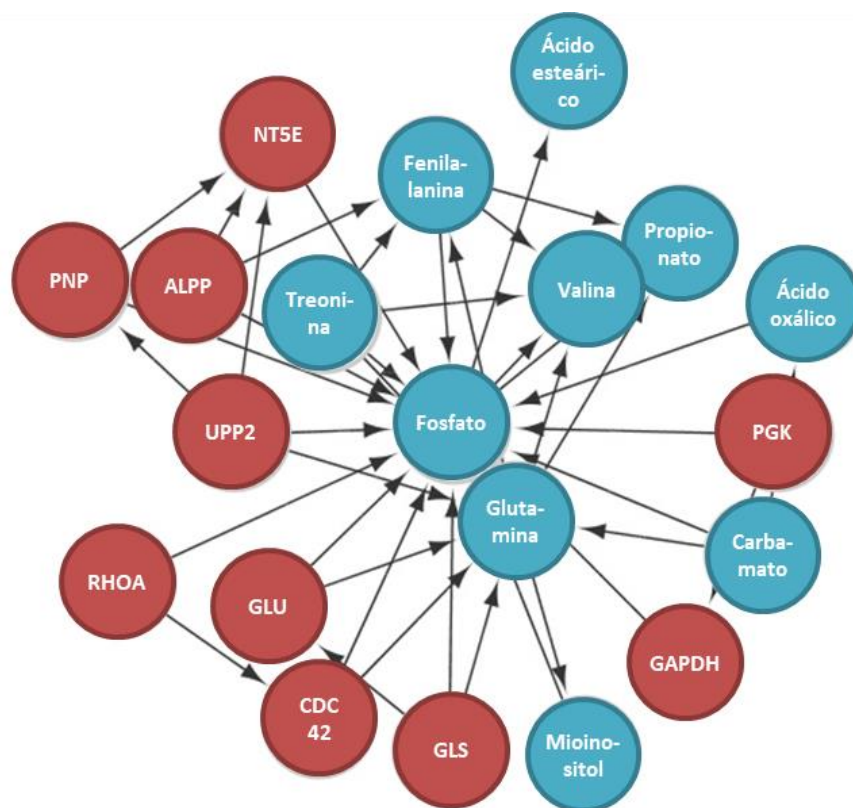


Figura 36. Red metabólica de conectividad de los metabolitos alterados tras la exposición a Surfynol (valores de $p < 0,05$ con un nivel de confianza del 95%).

Los datos obtenidos se sometieron a PCA para detectar patrones y visualizar fácilmente las alteraciones metabólicas entre ambos grupos experimentales, controles y muestras expuestas a Surfynol. Esta herramienta quimiométrica reduce la dimensionalidad de los datos multivariados a dos o tres PCs, que pueden ser visualizados gráficamente con mínima pérdida de información. Para ello, la matriz de datos se descompuso en matrices de scores (coordenadas de las muestras) y loadings (metabolitos), proporcionando información sobre muestras y variables, respectivamente.

En este estudio exploratorio dos componentes principales explicaron el 65,5% de la varianza acumulada. El gráfico de dispersión de las puntuaciones (*Figura 37*), obtenido para el modelo de PCA, utilizando para ello las áreas de pico normalizadas de todos metabolitos identificados, permitió determinar las diferencias metabólicas entre la población control y la población expuesta a Surfynol.

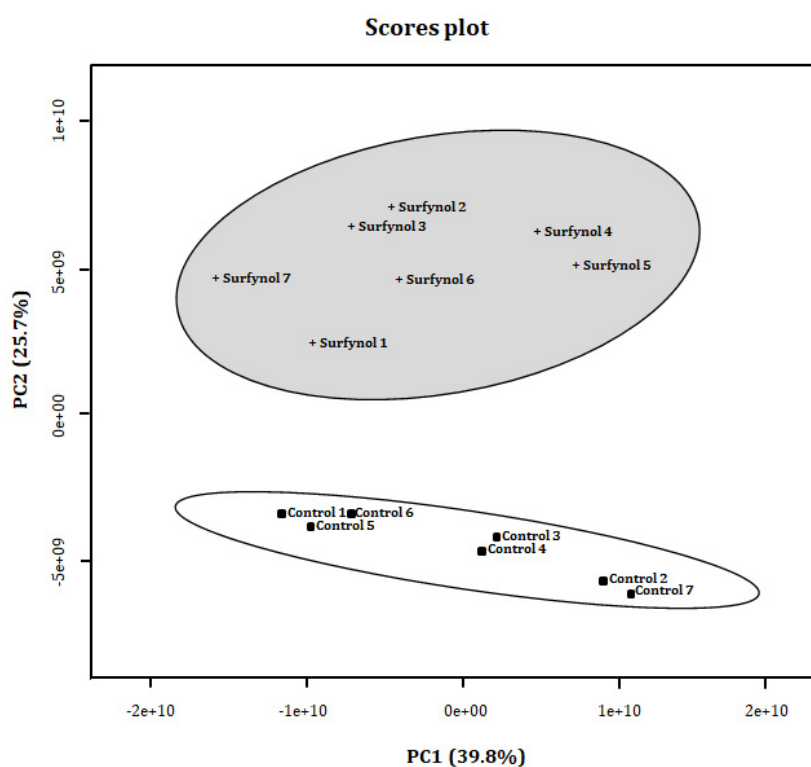


Figura 37. Representación del análisis multivariante de PCA para los metabolitos encontrados en células NTERA2 control y expuestas a 20 mg/L de Surfynol (n = 7).

Como puede observarse, las muestras control ($n = 7$) se agrupan y se colocan en la dirección opuesta a las muestras de células tratadas con Surfynol. Además, la agrupación de los scores pertenecientes a la misma población indicó una reproducibilidad fiable durante la preparación y el análisis de la muestra. Por lo tanto, el análisis de PCA ha demostrado ser muy efectivo para distinguir las células sanas de las células expuestas al Surfynol.

III. 1. e Metabolómica dirigida

A la vista de los resultados de identificación de proteínas realizados, se pretendió abordar la identificación y cuantificación de algunos metabolitos energéticos tales como el ATP, ADP, NADH y NAD^+ , que participan en la glicólisis, el ciclo de Krebs o la cadena respiratoria, utilizando el método de metabolómica dirigida optimizado en el capítulo anterior (sección II.1.e). Los cuatro metabolitos se determinaron en siete réplicas de células NTERA2 control y células expuestas a Surfynol (**Figura 38**).

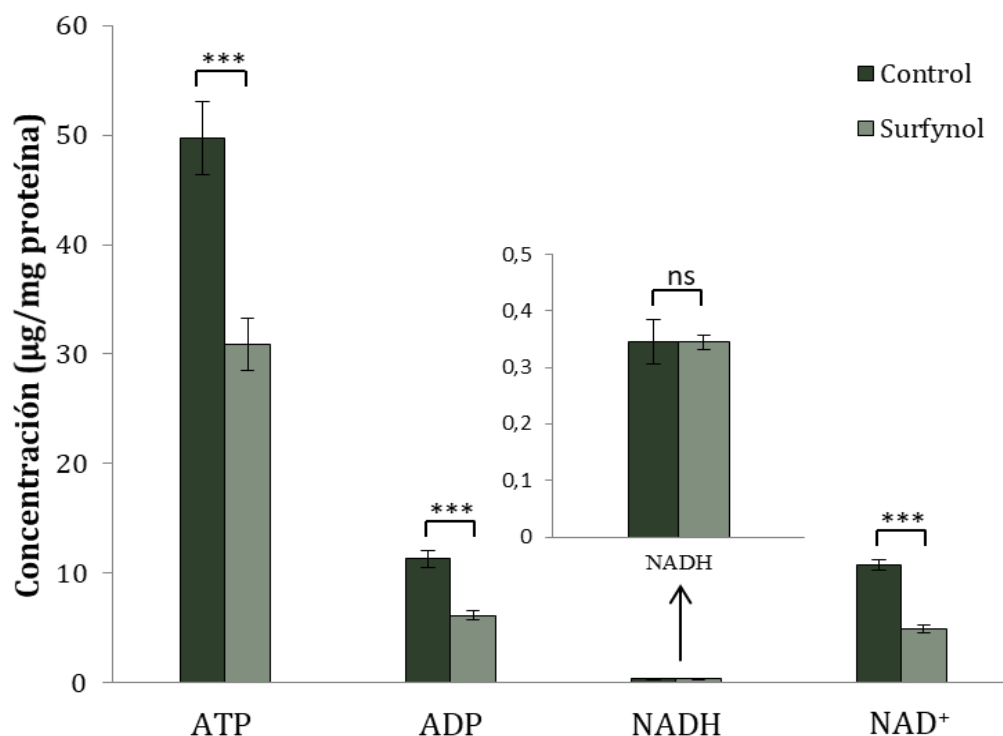


Figura 38. Niveles de los cuatro metabolitos cuantificados mediante metabolómica dirigida. Los datos se evaluaron mediante ANOVA y posterior test de Bonferroni. *** $p < 0,001$; ns, no significativo ($n = 7$).

La concentración de los metabolitos se normalizó con la concentración de proteína total cuantificada mediante el ensayo Bradford. El estudio estadístico ANOVA se realizó con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$) y junto con el test de Bonferroni demostraron la presencia de diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de ATP, ADP y NAD^+ en células expuestas al tensioactivo. Los niveles de estos tres metabolitos disminuyeron en células expuestas a Surfynol, mientras que la concentración de NADH permaneció inalterada.

III. 1. f Estudio de viabilidad en células somáticas

Con el objetivo de evaluar la toxicidad del Surfynol en células no-germinales se realizó el ensayo de viabilidad celular utilizando las líneas celulares somáticas HepG2 y HeLa (**Figura 39**).

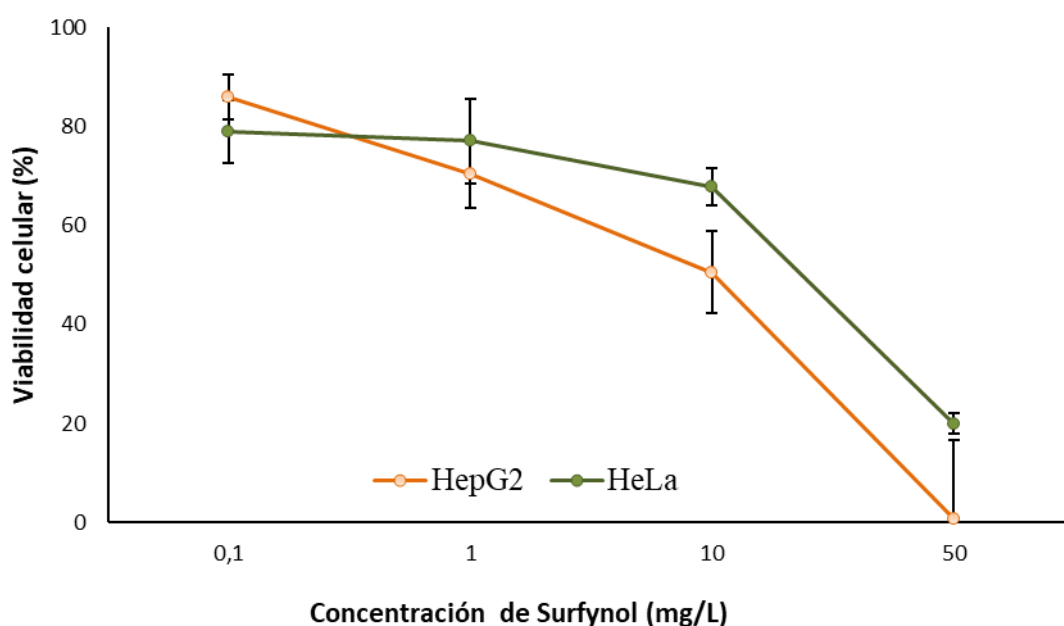


Figura 39. Representación de la disminución de la viabilidad de dos líneas celulares somáticas a medida que aumenta la concentración de Surfynol ($n = 5$).

Este estudio reveló el decrecimiento de la viabilidad celular a medida que aumentaba la concentración de Surfynol, siendo 50 mg/L y 72 h el nivel de exposición que originó la mayor pérdida de población para ambas líneas celulares. Además, este efecto tóxico se asemejó a los resultados obtenidos para las células germinales NTERA2, que presentaron un perfil de viabilidad celular frente a concentración de Surfynol muy similar.

III. 1. g Estudio de apoptosis celular

Estas mismas células somáticas se han utilizado para ensayos en los que se evaluó la apoptosis inducida por el tensioactivo. Los resultados de citometría de flujo mostraron una disminución en el número de células sanas para aquellas células expuestas a 20 mg/L de Surfynol durante 72 h (**Figura 40**). El estudio estadístico de la t de Student de dos colas ($p < 0,05$) reveló diferencias significativas entre el número de células apoptóticas y sanas entre triplicados de poblaciones control y poblaciones expuestas a Surfynol, pero no se vio afectado el número de células necróticas. Estos resultados demostraron que el Surfynol favorece la muerte celular por apoptosis en células somáticas a las condiciones testadas.

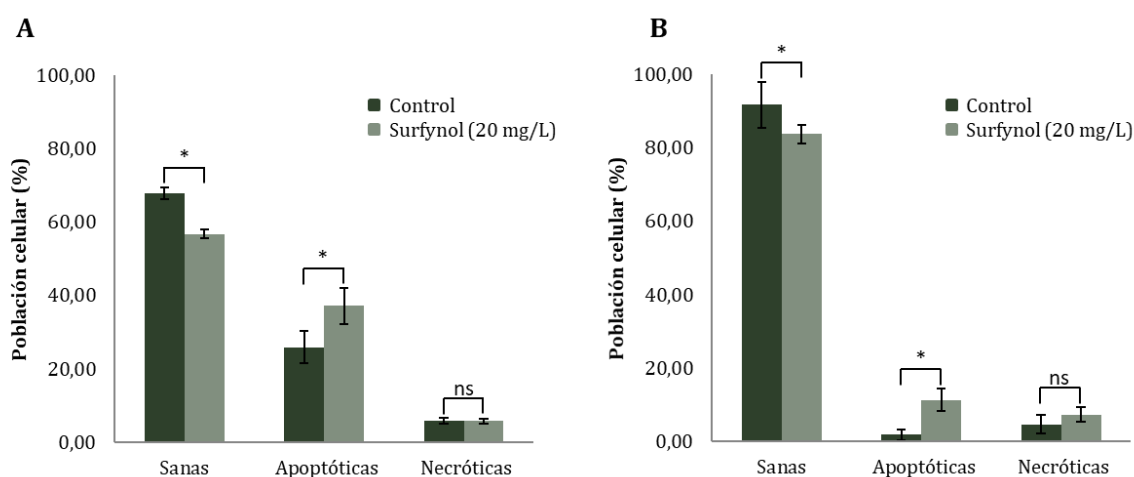


Figura 40. Porcentaje de población celular sana, apoptótica y necrótica tras su exposición a 20 mg/L de Surfynol. A, células HeLa; B, células HepG2. Los datos se evaluaron mediante el test de la t de Student a un nivel de confianza del 95%, * $p < 0,05$; ns, no significativo ($n = 3$).

III. 2 Discusión

Los estudios llevados a cabo han demostrado la toxicidad del Surfynol mediante el efecto del mismo sobre la viabilidad de células de carcinoma embrionario testicular NTERA2, que diferencian en espermatozoides. Por otro lado, estudiando en profundidad los resultados de las estrategias ómicas implementadas se ha podido deducir el mecanismo de toxicidad inducido por este tensioactivo que se ha esquematizado de forma simplificada en la **Figura 41**.

Entre todas las proteínas alteradas encontradas en el experimento de proteómica cuantitativa, varias de las que desempeñan funciones estructurales se encontraron inhibidas. Estas proteínas son componentes mayoritarios del citoesqueleto, las cuales proporcionan soporte estructural y motilidad a la célula, además de participar en procesos de señalización o en la mitosis celular [234]. Entre estas proteínas se encontró una inhibición significativa de la tubulina ($R_{\text{SILAC}} = -1,54$). Esta proteína constituye el 70% del axonema, orgánulo activo del flagelo del espermatozoide, por lo que su inhibición afectará negativamente al desarrollo del mismo [235]. Otras proteínas estructurales que aparecieron inhibidas fueron la actina ($R_{\text{SILAC}} = -1,95$) y varias proteínas que interaccionan con ella de alguna forma o que hacen de nexo como la filamina C ($R_{\text{SILAC}} = -2,37$), la transgelina ($R_{\text{SILAC}} = -2,60$) y la transgelina 2 ($R_{\text{SILAC}} = -1,88$); una proteína de unión llamada caldesmon ($R_{\text{SILAC}} = -2,31$); la proteína zyxin ($R_{\text{SILAC}} = -2,13$), que media la adhesión de la actina; y la fascina ($R_{\text{SILAC}} = -1,62$), involucrada en la organización de los filamentos de actina. La actina es una proteína clave presente en la cabeza, el cuello y la cola del espermatozoide, por todo ello tiene un papel crucial durante la espermatogénesis, en los procesos de diferenciación gradual, y en la función de fertilización del espermatozoide [236,237]. La inhibición de todas estas proteínas inducida por el Surfynol está relacionada con disfunciones en el citoesqueleto de actina, afectando por tanto a la capacidad de fertilización de las células expuestas. Así mismo, la sobreexpresión de la proteína asociada DAZ 1 ($R_{\text{SILAC}} = 2,47$) y de un factor de crecimiento derivado del hepatoma ($R_{\text{SILAC}} = 1,54$) se ha relacionado previamente con el desarrollo anormal de las células germinales, lo que se correlaciona con los resultados encontrados en este estudio [238,239]. El Surfynol también induce la inhibición de otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto del espermatozoide

como la tropomiosina ($R_{\text{SILAC}} = -2,28$), que es el motor de proteínas dependientes de actina implicadas en el movimiento del *cargo*; la catenina ($R_{\text{SILAC}} = 1,73$), que se asocia a la cadherina para producir complejos de unión a los filamentos de actina; la talina ($R_{\text{SILAC}} = -1,53$), que es una proteína involucrada en la organización del citoesqueleto; y la vimentina ($R_{\text{SILAC}} = -1,79$), localizada en la cabeza del espermatozoide y que cumple un papel fundamental en la fusión del espermatozoide con la superficie del óvulo durante la fertilización. La inhibición de esta serie de proteínas confirma la potencial reprotoxicidad asociada a la exposición a Surfynol [234,236].

Otro grupo de proteínas que se vieron inhibidas debido a la exposición a Surfynol y pueden afectar a la capacidad de fertilización del espermatozoide son la anexina A1 ($R_{\text{SILAC}} = -4,61$), que forma herodímeros con S100-A11 ($R_{\text{SILAC}} = -2,74$), la anexina A2 ($R_{\text{SILAC}} = -2,43$), que forma heterodímeros con S100-A10 ($R_{\text{SILAC}} = -4,03$), y la anexina A6 ($R_{\text{SILAC}} = -1,52$) [240,241]. Estas proteínas están relacionadas con la unión y liberación de iones Ca^{2+} , los cuales regulan la fertilización de los mamíferos al requerir el espermatozoide Ca^{2+} extracelular para dos procesos que preceden a la fertilización: la hiperactivación de la motilidad y la reacción del acrosoma [242].

Esta perturbación de la estructura y función del espermatozoide también se reflejó en los niveles de los metabolitos. La proporción de ácido esteárico ($R_{\text{M}} = 1,79$), también llamado octadecanoico, y de ácido oleico es crucial para la fluidez de la membrana. La regulación al alza de los niveles de estos ácidos grasos en nuestro estudio supone diferencias entre espermatozoides fértiles e infértiles [243]. Por otra parte, los nucleótidos de pirimidina juegan un papel crítico en el metabolismo celular sirviendo como precursores activados de ARN y ADN, fosfoglicérido de citidina difosfato-diacilglicerol para el ensamblaje de membranas celulares, y azúcares uridina difosfato (UDP) para la glicosilación de proteínas y la síntesis de glucógeno. La precipitación de oxalato de calcio es el resultado de un aumento de la concentración celular promedio de ácido polifosfórico ($R_{\text{M}} = 0,76$) que elimina o reduce el ácido oxálico ($R_{\text{M}} = 0,28$) metabólico mediante la formación de uracilo y ácido orótico, ambos intermedios naturales en la síntesis de pirimidinas. La disminución de la concentración de ácido fosfórico y oxálico, originada debido a la toxicidad del Surfynol, podría alterar esta vía y afectar también a la estructura de las membranas [244,245]. Finalmente, la

disminución significativa de mioinositol ($R_M = 0,78$) es la prueba del insuficiente desarrollo del espermatozoide. Este metabolito se sintetiza a partir de glucosa-6-fosfato, primer producto de la glicólisis, y es capaz de mejorar la función mitocondrial de los espermatozoides y la espermatogénesis, regulando la concentración de Ca^{2+} intracelular. De hecho, el mioinositol juega un papel crucial en la morfogénesis celular y la citogénesis y está involucrado en la formación de la membrana, la síntesis de lípidos y el crecimiento de la célula [246–248].

En los mamíferos, la motilidad del espermatozoide depende de la fuerza propulsora generada por el movimiento del flagelo, y esta fuerza la consigue gracias a la hidrólisis de ATP [249]. Entre el 10 y el 15% de la masa global de proteína en los axonemas son dineínas-ATPasas. La dineína 1 ($R_{SILAC} = -1,82$), proteína inhibida tras la exposición a Surfynol, actúa como micromotor encargado de transformar la energía química (ATP) en energía mecánica, y más del 70% de la actividad total de esta proteína está directamente acoplada con el movimiento de la célula [235]. Estudios previos han demostrado que la inhibición de la dineína 1, por ejemplo con vanadato, induce la inhibición de la motilidad de los cilios y el flagelo del espermatozoide [250]. Por ello se puede esperar un efecto negativo en la motilidad del espermatozoide originada por la toxicidad del tensioactivo. Otras proteínas involucradas en la motilidad del espermatozoide como Ras ($R_{SILAC} = -1,69$), la proteína quinasa dual activadora de mitógenos ($R_{SILAC} = -1,57$) y una proteína pequeña de unión a guanosín trifosfato (GTP) denominada Rho ($R_{SILAC} = -1,76$), cuya inactivación bloquea la motilidad del espermatozoide, también se encontraron inhibidas en las células NTERA2 expuestas a Surfynol [234,242].

La deficiencia de motilidad de los espermatozoides también se reflejó en el aumento de la concentración del metabolito treonina ($R_M = 2,44$), que es vital para coordinar la actividad del sistema de proteínas kinasas o inhibir la actividad de la proteína serina-treonina fosfatasa, enzima responsable del inicio del movimiento en espermatozoides inmaduros [251].

Los resultados obtenidos en los experimentos de proteómica y metabolómica también permitieron corroborar los resultados que indican un efecto tóxico del Surfynol sobre

la maquinaria que posee la célula para obtener energía e, indirectamente, sobre la motilidad de la misma. Considerando que la glicólisis es la principal ruta metabólica encargada de la producción de ATP en el espermatozoide maduro [235,242], se observaron varias proteínas inhibidas por efecto de la exposición a Surfynol y que participan en esta ruta metabólica: hexokinasa ($R_{\text{SILAC}} = -1.60$), piruvato kinasa isozima M1 ($R_{\text{SILAC}} = -1.64$) y M2 ($R_{\text{SILAC}} = -1.75$) y lactato deshidrogenasa A cadena 1 ($R_{\text{SILAC}} = 1.94$) y 3 ($R_{\text{SILAC}} = -1.94$), las cuales transforman piruvato en lactato. La inhibición de estas proteínas afecta a la producción de ATP e induce la deficiencia de lactato. En otros estudios se ha demostrado que el piruvato y el lactato son los encargados de mantener activa la síntesis de proteínas en espermatozoitos y están involucrados en los efectos de la hormona estimulante del folículo (FSH) durante la espermatogénesis. Esta proteína junto con la testosterona son las encargadas de iniciar este proceso de síntesis de espermatozoides en los testículos de mamíferos [252]. Además, las células germinales utilizan el lactato como sustrato para la producción de ATP en la fosforilación oxidativa llevada a cabo en la mitocondria; por este motivo la falta de lactato afectará a la viabilidad de células germinales masculinas [253]. Otras proteínas que participan en la cadena respiratoria y cuya expresión se vio inhibida por efecto del Surfynol son: NADH deshidrogenasa ($R_{\text{SILAC}} = -1.66$), citocromo c ($R_{\text{SILAC}} = -2.04$) y citocromo c oxidasa subunidades 5A ($R_{\text{SILAC}} = 1.57$), II ($R_{\text{SILAC}} = -1.82$) y 5B ($R_{\text{SILAC}} = -1.93$). El mantenimiento de los niveles de ATP durante el proceso de motilidad puede ser proporcionado por la creatina kinasa (CK). CK es una proteína fosfo-transferasa que cataliza la transferencia de un grupo fosfato para originar ATP. Esta proteína funciona como un regulador temporal y espacial de ATP, utilizado para mitigar problemas con el aporte o la demanda del mismo [235]. Esta proteína se encontró sobreexpresada en nuestro experimento ($R_{\text{SILAC}} = 1.54$), probablemente debido a la falta de producción de ATP durante los procesos de glicólisis y oxidación fosforilativa mitocondrial.

De la misma forma, algunos de los metabolitos alterados se asocian directa o indirectamente con rutas metabólicas que proporcionan la energía necesaria para la célula. La alteración de los niveles de fenilalanina ($R_M = 0.76$), que es un inhibidor alostérico de la proteína glicolítica piruvato kinasa, se relacionó directamente con la disminución de los niveles de ATP en la mitocondria y con el efecto, anteriormente mencionado, de la FSH durante la espermatogénesis [254]. Otros metabolitos, los

cuales aparecieron a concentraciones más elevadas en células expuestas a Surfynol, están involucrados con mecanismos alternativos existentes en la célula para obtener energía. Una de las mejores alternativas para obtener la energía que necesitan las células germinales es a través de la oxidación de la glutamina ($R_M = 2,69$) [255], pero también lo es la incorporación de la treonina ($R_M = 2,44$), la cual puede incorporarse a la glicólisis [256]. Además, el ácido propanoico ($R_M = 2,33$) que se transforma a propionil-CoA, puede ser introducido directamente en el ciclo de Krebs en lugar de la succinil-CoA, aumentando los niveles de oxalacetato cuyo excedente suele convertirse en gran medida en glucosa [212]. El metabolismo de la glucosa también se puede estimular mediante la conversión de valina ($R_M = 0,08$) en lípidos; sin embargo, los niveles de este metabolito se encontraron por debajo de los basales en células expuestas a Surfynol, lo cual puede ser debido a que el alto contenido de glutamina inhibe la presencia de la leucina, valina y alanina como fuentes de energía [255]. El glioxilato y el ácido L-ascórbico parecen ser los precursores del ácido oxálico ($R_M = 0,28$), este metabolito cuyos niveles decrecieron por efecto del Surfynol, es un metabolito involucrado entre otras cosas en el proceso de obtención de energía mediante el ciclo de Krebs. Las enzimas que lo sintetizan son la lactato deshidrogenasa y la glicolato oxidasa, la primera de ellas anteriormente mencionada como proteína inhibida [257].

La confirmación de esta desregulación energética se llevó a cabo mediante los estudios de metabolómica dirigida en los que se cuantificaron la concentración de los cuatro metabolitos energéticos más importantes: ATP, ADP, NADH y NAD⁺. La deficiencia de ATP observada en células expuestas a Surfynol se debe, sin duda, a la inhibición de proteínas, previamente mencionadas, como la piruvato kinasa, que se encarga directamente de la síntesis de ATP en la ruta de la glicólisis. Además, la inhibición de otras proteínas dejan entrever la alteración de las otras dos rutas metabólicas más importantes encargadas de la síntesis ATP: el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria [258]. El hecho de que los niveles de ADP intracelulares también disminuyeron tras la exposición a Surfynol reafirma la inhibición de la proteína dineína ATPasa incapaz de hidrolizar el ATP para obtener ADP y movimiento [235,249]. A pesar de que numerosas proteínas fueron inhibidas por efecto del Surfynol, las proteínas gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa aparecieron ambas inalteradas,

esto puede explicar el hecho de que los niveles de NADH no se perturbaron por acción del tensioactivo, ya que ambas proteínas tienen como función biológica la síntesis de NADH. Sin embargo, el contenido de NAD⁺ decreció de la misma forma que lo hizo la proteína NADH deshidrogenasa, principal componente del complejo I, involucrado directamente con la transferencia de electrones y protones para producir ATP en la cadena respiratoria. Además, los bajos niveles de NAD⁺ pueden relacionarse con la toxicidad del Surfynol, considerando que otros estudios han citado que el NAD⁺ puede generar la síntesis de ROS y que su depleción induce la muerte celular [259].

Las proteínas antioxidantes son necesarias para la supervivencia de las células germinales, ya que éstas juegan un papel fundamental protegiendo a las células del daño provocado por el estrés oxidativo y, en el caso del espermatozoide, también de la pérdida de motilidad. Muchas de las proteínas que constituyen el mecanismo de defensa celular aparecieron inhibidas por efecto del Surfynol: glutatión peroxidasa 7 (R_{SILAC} = -1,51) y 1 (R_{SILAC} = -1,90), necesaria para la motilidad del espermatozoide, y otros antioxidantes más conocidos como las proteínas glutatión S-transferasa 3 (R_{SILAC} = -1,64) y omega-1 (R_{SILAC} = -1,79) [234,242,260]. En este contexto, el ácido ascórbico, es un poderoso antioxidante lipofílico que juega un papel absolutamente vital en el control de la espermatogénesis de mamíferos. El hecho de encontrar niveles bajos de este ácido se ha relacionado con plasma seminal infértil y con baja motilidad del espermatozoide [234,261,262]. Hay dos mecanismos moleculares para obtener ácido ascórbico en el organismo, los dos empiezan con la transformación de glucosa en glucosa 6-fosfato por la enzima hexokinasa (R_{SILAC} = -1,60). Esta enzima se encontró inhibida en nuestro experimento, lo cual puede relacionarse con la disminución de los niveles de ácido ascórbico en la célula y con la consecuente disminución de la motilidad inducida por la exposición a Surfynol. Este hecho puede confirmarse con la inhibición de otras dos enzimas adicionales: fosfomanomutasa (R_{SILAC} = -2,72), que transforma la manosa-6-P en manosa-1-P; y la UDP-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (R_{SILAC} = -1,62), y las convierte en UDP-D-glucosa y UDP-D-glucuronato, siendo ambas transformaciones necesarias para las rutas metabólicas de biosíntesis del ácido ascórbico. Los inmunosupresores como proteasomas, poliaminas (espermina y espermidina) y factores de crecimiento también se encuentran involucrados en la protección del espermatozoide de la pérdida de motilidad inducida por especies reactivas del oxígeno

[242,263]. La espermina sintetasa, una proteína que regula la formación de espermina, se encontró inhibida tras la exposición a Surfynol ($R_{\text{SILAC}} = -1,88$). Además, el factor de crecimiento y diferenciación 3 ($R_{\text{SILAC}} = -3,28$), que es un marcador de pluripotencia en células germinales testiculares y tiene un efecto protector sobre las mismas, también se encontró inhibido [264,265]. El ácido oxálico, que como hemos visto anteriormente apareció en concentraciones inferiores por efecto del Surfynol, también es un metabolito que participa en importantes mecanismos de defensa [266].

Por otro lado, otras proteínas que se presentaron sobreexpresadas indicaban una respuesta general de la célula contra la toxicidad del Surfynol. Tal es el caso de las proteínas del choque térmico 70 kDa ($R_{\text{SILAC}} = 1,78$) y 75 kDa ($R_{\text{SILAC}} = 1,53$), las cuales regulan mecanismos de defensa contra diferentes tipos de estrés [198], o la proteína inductora de la condensación de cromatina apoptótica en el núcleo isoforma 1 ($R_{\text{SILAC}} = 2,10$), que induce la muerte celular por apoptosis en células dañadas [267]. Siguiendo en esta línea, la glucuronidación es un mecanismo importante activado por los sistemas de mamíferos para degradar y eliminar los productos químicos endógenos y exógenos extraños, como puede ser el Surfynol. El ácido carbámico ($R_{\text{M}} = 1,56$), que es un sustrato para la glucuronidación, apareció en concentraciones superiores en nuestro estudio de metabolómica no dirigida. Este metabolito al ser transformado en otro de glucurónido de carbamato estable confirma la activación de este mecanismo [268]. Además, un alto contenido de glutamina y treonina activa el mecanismo de defensa de las células y la respuesta al estrés. Están implicados en favorecer la oxidación de la glucosa, la inhibición de la apoptosis, la activación de mecanismos que implican el funcionamiento de la cadena respiratoria y la reparación de la muerte celular, este último incluye la regulación positiva de la expresión de las proteínas de choque térmico que hemos visto sobreexpresadas en los estudios de proteómica cuantitativa, a través de un mecanismo dependiente de la glucosamina [59,269,270].

Por todo ello, los resultados obtenidos del experimento SILAC y los dos experimentos de metabolómica dirigida y no dirigida han demostrado la inhibición significativa de proteínas clave y de rutas metabólicas involucradas directamente en la capacidad de fertilización, afectando tanto al citoesqueleto y la motilidad del espermatozoide, como al

metabolismo energético y a los mecanismos de defensa contra la oxidación. Estos resultados demuestran la potencial reprotoxicidad del Surfynol.

Por otro lado, los estudios realizados sobre células somáticas arrojan la idea de que la toxicidad de este tensioactivo puede afectar por igual a todo tipo de líneas celulares. Esto se refleja en el hecho de que la viabilidad celular se ve afectada de una forma semejante en células germinales y no germinales, y también a la capacidad evidenciada del Surfynol de inducir muerte celular por apoptosis en dos tipos de líneas celulares somáticas. A la vista de estos resultados y, aunque habría que ampliar los estudios toxicológicos, todo apunta que el metabolismo energético de las células somáticas y su mecanismo de defensa puede estar afectado de forma similar al de células germinales debido a la toxicidad del Surfynol, el cual podría afectar incluso a la morfología y al desarrollo de las mismas.

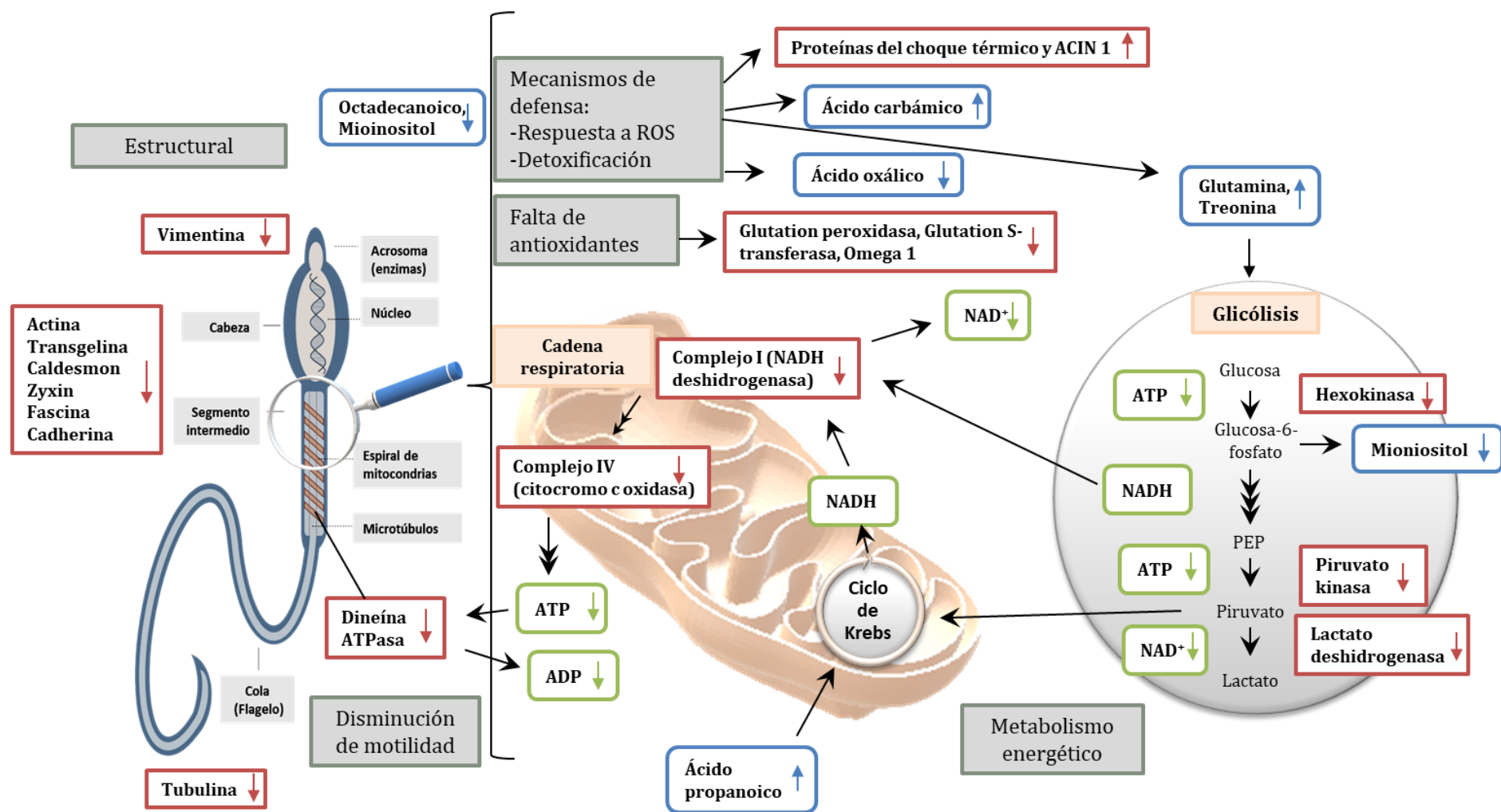


Figura 41. Principales rutas metabólicas asociadas con el mecanismo de toxicidad del Surfyinol, deducido mediante técnicas de proteómica (rojo), metabolómica no dirigida (azul) y metabolómica dirigida (verde).

CONCLUSIONES

A decorative graphic consisting of two thin white lines intersecting at a right angle. One line is horizontal, starting from the left edge of the page and ending at the right edge, passing through the text. The other line is vertical, starting from the top edge of the page and extending downwards, also passing through the text.

Tras la realización de la presente Tesis doctoral ha quedado demostrada la utilidad y necesidad de emplear las técnicas ómicas, especialmente la proteómica y la metabolómica, como complemento a otros estudios toxicológicos. De la aplicación de estas técnicas para evaluar los mecanismos moleculares de toxicidad inducidos por los tres compuestos de diferente naturaleza seleccionados, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Las nanopartículas de CdSe/ZnS resultan citotóxicas para una gran variedad de líneas celulares en mayor o menor medida. Mediante microscopía de fluorescencia se ha mostrado la estabilidad de estos QDs transcurridas 72 h y se ha verificado que las NPs se internalizan gradualmente en las células HepG2 e invaden el citoplasma celular tras 12 h de exposición a las mismas. Las micrografías obtenidas mediante TEM han revelado la localización intracelular de estas nanopartículas en vacuolas y mitocondrias, sin que hayan penetrado la membrana nuclear. Los experimentos de proteómica cuantitativa *in vitro* (SILAC) e *in vivo* (super-SILAC), han permitido identificar un total de 54 y 28 proteínas, respectivamente, alteradas tras la exposición a estos QDs. La

aplicación de la estrategia super-SILAC necesitó de una optimización previa al ser la primera vez que esta técnica se ha aplicado al modelo del pez cebra. Las proteínas alteradas han permitido identificar el mecanismo de toxicidad asociado a estas nanopartículas, que inducen la generación de ROS y apoptosis celular a través de mecanismos convencionales y menos convencionales. Dentro de estos últimos se encuentra la formación de agregados de la proteína TDP-43. Se ha puesto de manifiesto el efecto tóxico ejercido por estos QDs en el desarrollo del organismo, así como la inducción de diversos problemas locomotores y neuronales. Debido a esto, y aunque no puede extrapolarse este mecanismo concreto de toxicidad para todos los tipos de QDs, los resultados obtenidos sí pueden ser empleados como referencia para concienciar y controlar la aplicación de QDs, sus vertidos residuales y, especialmente, su utilización en medicina.

- Los experimentos de metabolómica han permitido complementar los numerosos estudios de toxicidad realizados para el MeHg, confirmando su capacidad para alterar la glicólisis, el ciclo de Krebs, la cadena respiratoria, desencadenar la respuesta antioxidante y revelando el efecto tóxico y potencialmente carcinogénico del mismo a través de la activación del ciclo de la urea. Estos experimentos se han llevado a cabo tras la optimización de dos métodos para la extracción de metabolitos celulares. Así mismo, se ha podido concluir que el Se(IV) es un elemento esencial que, entre otros muchos beneficios, tiene la capacidad de proteger a las células del impacto tóxico que supone la exposición a MeHg, quedando reflejado en la recuperación de las condiciones basales de varios metabolitos. Especialmente relevante ha sido la recuperación observada de diversos metabolitos energéticos tras la co-administración de Se(IV). Estos resultados han permitido profundizar aún más en los mecanismos de toxicidad del MeHg y en el papel protector del Se(IV), especialmente a nivel metabólico.
- El Surfynol origina la alteración de la estructura, función y motilidad de los espermatozoides, siendo el principal problema toxicológico las anormalidades encontradas en las vías de producción de ATP y otros metabolitos energéticos.

El presente trabajo ha confirmado estos resultados a través del empleo de estrategias de proteómica y metabolómica para identificar un total de 108 proteínas y 10 metabolitos alterados por efecto de este tensioactivo. Los estudios de viabilidad celular junto con los citados estudios ómicos han corroborado el efecto negativo causado por este tensioactivo en células germinales precursoras de espermatozoides y en la capacidad de fertilización de las mismas. También se ha demostrado su citotoxicidad en las células somáticas. El conjunto de resultados han demostrado el potencial reprotóxico de este compuesto, poniéndose de manifiesto la necesidad de implantar controles y una regulación más estricta para el empleo del Surfynol, especialmente considerando que su uso como adhesivo en envases para alimentos está muy extendido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D.L. Eaton, E.P. Gallagher, General Overview of Toxicology, in: Charlene A. McQueen (Ed.), Compr. Toxicol. (Second Ed., Elsevier Ltd, 2010: pp. 1–46. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846001019>.
- [2] D. Milles, History of Toxicology, in: Toxicology, Academic Press, 1999: pp. 11–23.
- [3] A.A. Pappas, N.A. Massoll, donald J. Cannon, Toxicology : Past , Present , and Future, Ann. Clin. Lab. Sci. 29 (1999) 253–262.
- [4] OECD, Test Guidelines for the Chemicals, (1981). <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforhetestingofchemicals.htm> (accessed July 9, 2019).
- [5] D. Krewski, D.J. Acosta, M. Andersen, H. Anderson, J.C. Bailar III, K. Boekelheide, R. Brent, G. Charnley, V.G. Cheung, S. Green Jr., K.T. Kelsey, N.I. Kerkvliet, A.A. Li, L. McCray, O. Meyer, R.D. Patterson, W. Pennie, R.A. Scala, G.M. Solomon, M. Stephens, J. Yager, L. Zeise, Toxicity Testing in the 21St Century: a Vision and a Strategy, Natl. Acad. Sci. 13 (2007) 51–138. doi:10.1080/10937404.2010.483176.
- [6] J. Steber, The Ecotoxicity of Cleaning Product Ingredients, in: Handb. Cleaning/Decontamination Surfaces, Elsevier Ltd, 2007: pp. 721–746. doi:10.1016/B978-044451664-0/50022-X.
- [7] P.C. Lin, S. Lin, P.C. Wang, A.R. Sridhar, Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials, Biotechnol. Adv. 32 (2014) 711–726. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.006.Techniques.
- [8] M. Palomo-Siguero, M.I. López-Heras, C. Cámara, Y. Madrid, Accumulation and biotransformation of chitosan-modified selenium nanoparticles in exposed radish (*Raphanus sativus*), J. Anal. At. Spectrom. 30 (2015) 1237–1244. doi:10.1039/c4ja00407h.
- [9] M.K. Parr, O. Montacir, H. Montacir, Physicochemical characterization of biopharmaceuticals, J. Pharm. Biomed. Anal. 130 (2016) 366–389. doi:10.1016/j.jpba.2016.05.028.
- [10] A. Cecinato, P. Romagnoli, M. Perilli, C. Balducci, Nonylphenol and Bisphenol A in Ambient Particulates: A Preliminary Approach in Italy, Environ. Toxicol. Stud. J. 1 (2017) 1–8.
- [11] A. a. Guedez, S. Frömmel, P. Diehl, W. Püttmann, Occurrence and temporal variations of TMDD in the river Rhine, Germany, Environ. Sci. Pollut. Res. 17 (2010) 321–330. doi:10.1007/s11356-009-0191-8.
- [12] P. Rzymiski, P. Klimaszuk, W. Marszelewski, D. Borowiak, M. Mleczeek, K. Nowiński, B. Pius, P. Niedzielski, B. Poniedziałek, Correction to: The chemistry and toxicity of discharge waters from copper mine tailing impoundment in the valley of the Apuseni Mountains in Romania, Environ.

- Sci. Pollut. Res. (2018) 1. doi:10.1007/s11356-018-2001-7.
- [13] T.O. Omotunde, M.B. Adekemi, A.O. Olusegun, A.A. Adeleke, Speciation of Heavy Metal (Cd and Pb) of some Dumpsites Soil in Lagos State, Nigeria Using Atomic Absorption Spectrophotometry, *Adv. Appl. Sci. Res.* 2 (2011) 247–253.
- [14] E. Piccoli, D. Mazzilis, E. Gava, S. De Martin, Study of Nanoparticles in a Few Rivers in North East Italy using SP-ICP-MS Reagents, standards and materials, *Nano Res. Appl.* 4 (2018) 1–5. doi:10.21767/2471-9838.100030.
- [15] G. Prasuna Solomon, V. Pavani, A. Nageswara Rao, Food chain bioaccumulation of lead in *Chrissia halyi* (Ferguson 1969) using *cladophora* as feed, *Eur. J. Exp. Biol.* 2 (2012) 83–87.
- [16] W.K. Dodds, M.R. Whiles, Responses to Stress, Toxic Chemicals, and Other Pollutants in Aquatic Ecosystems, in: *Freshw. Ecol.*, Elsevier, 2010: pp. 399–436. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123747242000167>.
- [17] S. Zarco-Fernández, A. García-García, J. Sanz-Landaluze, C. Pecheyran, R. Muñoz-Olivas, In vivo bioconcentration of a metal mixture by *Danio rerio* eleutheroembryos, *Chemosphere*. 196 (2018) 87–94. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.12.141.
- [18] T.V.R.K. Rao, A. Kumar, Effect of some inorganic and organic anions on aluminium toxicity to a fresh water fish, *Channa punctatus* Pelagia Research Library, *Eur. J. Exp. Biol.* 4 (2014) 126–130.
- [19] I. Moraleja, M.L. Mena, A. Lázaro, B. Neumann, A. Tejedor, N. Jakubowski, M.M. Gómez-Gómez, D. Esteban-Fernández, An approach for quantification of platinum distribution in tissues by LA-ICP-MS imaging using isotope dilution analysis, *Talanta*. 178 (2018) 166–171. doi:10.1016/j.talanta.2017.09.031.
- [20] R. Raina-fulton, N. Dunn, Z. Xie, Pesticides and Their Degradation Products Including Metabolites: Chromatography-Mass Spectrometry Methods, in: M. Aliofkhazraei (Ed.), *Mass Spectrom.*, Intech Open, 2017: pp. 95–132. <https://www.intechopen.com/books/mass-spectrometry/pesticides-and-their-degradation-products-including-metabolites-chromatography-mass-spectrometry-met>.
- [21] Y. Picó, D. Barceló, The expanding role of LC-MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 821–835. doi:10.1016/j.trac.2008.08.009.
- [22] M.J. García-Galán, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 1008–1022. doi:10.1016/j.trac.2008.10.001.

- [23] K. Raja, M. Patrick, Y. Gao, D. Madu, Y. Yang, L.C. Tsoi, A Review of Recent Advancement in Integrating Omics Data with Literature Mining towards Biomedical Discoveries, *Int. J. Genomics*. 2017 (2017) 1–10. doi:10.1155/2017/6213474.
- [24] Y. Hasin, M. Seldin, A. Lusi, Multi-omics approaches to disease, *Genome Biol.* 18 (2017) 1–15. doi:10.1186/s13059-017-1215-1.
- [25] R.P. Horgan, L.C. Kenny, SAC review ‘Omic’ technologies : proteomics and metabolomics, *Obstet. Gynaecol.* 13 (2011) 189–195. doi:10.1576/toag.13.3.189.27672.
- [26] M. Tsurumaki, M. Kotake, M. Iwasaki, M. Saito, K. Tanaka, W. Aw, S. Fukuda, M. Tomita, The application of omics technologies in the functional evaluation of inulin and inulin-containing prebiotics dietary supplementation, *Nutr. Diabetes.* 5 (2015) 1–9. doi:10.1038/nutd.2015.35.
- [27] S. Balu, T. Xenakis, C. Frainay, F. Jourdan, M. Biserni, E. Wozniak, C.A. Mein, R. Mesnage, M.N. Antoniou, N. Poupin, Integrated transcriptomics and metabolomics reveal signatures of lipid metabolism dysregulation in HepaRG liver cells exposed to PCB 126, *Arch. Toxicol.* 92 (2018) 2533–2547. doi:10.1007/s00204-018-2235-7.
- [28] L. Selley, D.H. Phillips, I. Mudway, The potential of omics approaches to elucidate mechanisms of biodiesel-induced pulmonary toxicity, *Part. Fibre Toxicol.* 16 (2019) 1–16. doi:10.1186/s12989-018-0284-y.
- [29] A.R. Lehmann, The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases, *Genes Dev.* 15 (2001) 15–23. doi:10.1101/gad.859501.GENES.
- [30] O. V. Singh, Proteomics and metabolomics: The molecular make-up of toxic aromatic pollutant bioremediation, *Proteomics.* 6 (2006) 5481–5492. doi:10.1002/pmic.200600200.
- [31] T.R. Shah, A. Misra, *Proteomics*, Elsevier Ltd, 2011.
- [32] A. Pandey, M. Mann, Proteomics to study genes and genomes., *Nature.* 405 (2000) 837–846. doi:10.1038/35015709.
- [33] P.R. Graves, T. a J. Haystead, *Molecular Biologist’s Guide to Proteomics*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (2002) 39–63. doi:10.1128/MMBR.66.1.39.
- [34] J.R. Yates, S. Speicher, P.R. Griffin, T. Hunkapiller, Peptide mass maps: A highly informative approach to protein identification, *Anal. Biochem.* 214 (1993) 397–408. doi:10.1006/abio.1993.1514.
- [35] P. James, M. Quadroni, E. Carafoli, G. Gonnet, Protein identification by mass profile fingerprinting,

- Biochem. Biophys. Res. Commun. 195 (1993) 58–64. doi:10.1006/bbrc.1993.2009.
- [36] W.J. Henzel, T.M. Billeci, J.T. Stults, S.C. Wong, C. Grimley, C. Watanabe, Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 5011–5. doi:10.1073/pnas.90.11.5011.
- [37] A. Shevchenko, O.N. Jensen, A. V. Podtelejnikov, F. Sagliocco, M. Wilm, O. Vorm, P. Mortensen, A. Shevchenko, H. Boucherie, M. Mann, Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (1996) 14440–14445. doi:10.1073/pnas.93.25.14440.
- [38] A. Elamin, B. Titz, S. Dijon, C. Merg, M. Geertz, T. Schneider, F. Martin, W.K. Schlage, S. Frentzel, F. Talamo, B. Phillips, E. Veljkovic, N. V. Ivanov, P. Vanscheeuwijck, M.C. Peitsch, J. Hoeng, Quantitative proteomics analysis using 2D-PAGE to investigate the effects of cigarette smoke and aerosol of a prototypic modified risk tobacco product on the lung proteome in C57BL/6 mice, *J. Proteomics.* 145 (2016) 237–245. doi:10.1016/j.jpro.2016.05.037.
- [39] A. Campos, G. Danielsson, A.P. Farinha, J. Kuruvilla, P. Warholm, S. Cristobal, Shotgun proteomics to unravel marine mussel (*Mytilus edulis*) response to long-term exposure to low salinity and propranolol in a Baltic Sea microcosm, *J. Proteomics.* 137 (2016) 97–106. doi:10.1016/j.jpro.2016.01.010.
- [40] P. Cabezas-Sánchez, E. García-Calvo, C. Cámara, J.L. Luque-García, A quantitative proteomic approach for unveiling novel mechanisms associated with MeHg-induced toxicity: Effects on the methylation cycle, *Toxicol. Res. (Camb).* 5 (2016) 291–302. doi:10.1039/c5tx00354g.
- [41] S. Gioria, P. Urbán, M. Hajduch, P. Barboro, N. Cabaleiro, R. La Spina, H. Chassaigne, Proteomics study of silver nanoparticles on Caco-2 cells, *Toxicol. Vitro.* 50 (2018) 347–372. doi:10.1016/j.tiv.2018.03.015.
- [42] J. Tomé-Carneiro, M.C. Crespo, E. García-Calvo, J.L. Luque-García, A. Dávalos, F. Visioli, Proteomic evaluation of mouse adipose tissue and liver following hydroxytyrosol supplementation, *Food Chem. Toxicol.* 107 (2017) 329–338. doi:10.1016/j.fct.2017.07.009.
- [43] Y. Zhen, J.-L. Qi, S.-S. Wang, J. Su, G.-H. Xu, M.-S. Zhang, L. Miao, X.-X. Peng, D. Tian, Y.-H. Yang, Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean, *Physiol. Plant.* 131 (2007) 542–554. doi:10.1111/j.1399-3054.2007.00979.x.
- [44] P. Kieffer, J. Dommes, L. Hoffmann, J.-F. Hausman, J. Renaut, Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants, *Proteomics.* 8 (2008) 2514–2530. doi:10.1002/pmic.200701110.

- [45] S. Cuello, S. Ramos, Y. Madrid, J.L. Luque-García, C. Cámara, Differential protein expression of hepatic cells associated with MeHg exposure: deepening into the molecular mechanisms of toxicity, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 315–324. doi:10.1007/s00216-012-6042-3.
- [46] C.J. Martyniuk, S. Alvarez, N.D. Denslow, DIGE and iTRAQ as biomarker discovery tools in aquatic toxicology, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76 (2012) 3–10. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.09.020.
- [47] S. Kalayou, C. Granum, H.F. Berntsen, P.K. Groseth, S. Verhaegen, L. Connolly, I. Brandt, G.A. de Souza, E. Ropstad, Label-free based quantitative proteomics analysis of primary neonatal porcine Leydig cells exposed to the persistent contaminant 3-methylsulfonyl-DDE, *J. Proteomics.* 137 (2016) 68–82. doi:10.1016/j.jprot.2015.12.007.
- [48] S. Dagley, D.E. Nicholson, An introduction to metabolic pathways, in: *Q. Rev. Biol.*, 1971: pp. 288–343. doi:10.1086/406923.
- [49] L. Sapienza, *The Role of Metabolomics in Cancer researches*, Elsevier BV., 2007. doi:10.1016/B978-0-444-52841-4.50014-X.
- [50] D.S. Wishart, Quantitative metabolomics using NMR, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 228–237. doi:10.1016/j.trac.2007.12.001.
- [51] M. Bedair, L.W. Sumner, Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 238–250. doi:10.1016/j.trac.2008.01.006.
- [52] K. Burgess, N. Rankin, S. Weidt, Metabolomics, in: *Handb. Pharmacogenomics Stratif. Med.*, Academic Press, 2014: pp. 181–205.
- [53] A.C. Schrimpe-Rutledge, S.G. Codreanu, S.D. Sherrod, J.A. Mclean, Untargeted metabolomics strategies-Challenges and Emerging Directions HHS Public Access, *J Am Soc Mass Spectrom.* 27 (2016) 1897–1905. doi:10.1007/s13361-016-1469-y.
- [54] C.B. Clish, Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine, *Mol. Case Stud.* 1 (2015) 1–6. <http://molecularcasestudies.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/mcs.a000588>.
- [55] M. Gerlich, S. Neumann, MetFusion: Integration of compound identification strategies, *J. Mass Spectrom.* 48 (2013) 291–298. doi:10.1002/jms.3123.
- [56] A. Scalbert, L. Brennan, O. Fiehn, T. Hankemeier, B.S. Kristal, B. van Ommen, E. Pujos-Guillot, E. Verheij, D. Wishart, S. Wopereis, Mass-spectrometry-based metabolomics: Limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research, *Metabolomics.* 5 (2009) 435–458. doi:10.1007/s11306-009-0168-0.

- [57] J.M. Halket, D. Waterman, A.M. Przyborowska, R.K.P. Patel, P.D. Fraser, P.M. Bramley, Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS, *J. Exp. Bot.* 56 (2005) 219–243. doi:10.1093/jxb/eri069.
- [58] J. Liu, Y. Liu, Y. Wang, A. Abozeid, Y.G. Zu, Z.H. Tang, The integration of GC–MS and LC–MS to assay the metabolomics profiling in *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* reveals a tissue- and species-specific connectivity of primary metabolites and ginsenosides accumulation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 135 (2017) 176–185. doi:10.1016/j.jpba.2016.12.026.
- [59] B. Zhang, H. Zhang, C. Du, Q.X. Ng, C. Hu, Y. He, C.N. Ong, Metabolic responses of the growing *Daphnia similis* to chronic AgNPs exposure as revealed by GC-Q-TOF/MS and LC-Q-TOF/MS, *Water Res.* 114 (2017) 135–143. doi:10.1016/j.watres.2017.02.046.
- [60] P. Hušek, Z. Švagera, D. Hanzlíková, I. Karlínová, L. Řimnáčová, H. Zahradníčková, P. Šimek, GC-MS Metabolomic Profiling of Protic Metabolites Following Heptafluorobutyl Chloroformate Mediated Dispersive Liquid Microextraction Sample Preparation Protocol, in: *Metab. Profiling Methods Protoc. Methods Mol. Biol.*, Springer Nature 2018, 2018: pp. 155–170.
- [61] K. Zhao, J. Zhang, Z. Xu, Y. Xu, A. Xu, W. Chen, C. Miao, S. Liu, Z. Wang, R. Jia, Metabolomic Profiling of Human Spermatozoa in Idiopathic Asthenozoospermia Patients Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Biomed Res. Int.* 2018 (2018) 1–8. doi:10.1155/2018/8327506.
- [62] K. Patel, J. Zhang, S. Ren, Rare-earth-free high energy product manganese-based magnetic materials, *Nanoscale.* 10 (2018) 11701–11718. doi:10.1039/c8nr01847b.
- [63] K. Ghosal, A. Ghosh, Carbon dots: The next generation platform for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 96 (2019) 887–903. doi:10.1016/j.msec.2018.11.060.
- [64] V.S. Manikandan, B.R. Adhikari, A. Chen, Nanomaterial based electrochemical sensors for the safety and quality control of food and beverages, *Analyst.* 143 (2018) 4537–4554. doi:10.1039/c8an00497h.
- [65] J.L. Luque-García, R. Sánchez-Díaz, I. López-Heras, C. Cámara, P. Martín, Bioanalytical strategies for in-vitro and in-vivo evaluation of the toxicity induced by metallic nanoparticles, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 254–268. doi:10.1016/j.trac.2012.11.004.
- [66] G.P.C. Drummen, Quantum dots - From synthesis to applications in biomedicine and life sciences, *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010) 154–163. doi:10.3390/ijms11010154.
- [67] M. Green, The Preparation of II–VI Semiconductor Nanomaterials, in: *R.S. of Chemistry (Ed.), Semicond. Quantum Dots Organomet. Inorg. Synth.*, 2014: pp. 1–277.

- [68] F. Alam, N. Yadav, Potential applications of quantum dots in mapping sentinel lymph node and detection of micrometastases in breast carcinoma., *J. Breast Cancer.* 16 (2013) 1–11. doi:10.4048/jbc.2013.16.1.1.
- [69] F.A. Esteve-turrillas, A. Abad-fuentes, Biosensors and Bioelectronics Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes, *Biosens. an Bioelectron.* 41 (2013) 12–29.
- [70] X. Li, L. Wang, Y. Fan, Q. Feng, F.Z. Cui, Biocompatibility and toxicity of nanoparticles and nanotubes, *J. Nanomater.* 2012 (2012) 1–9. doi:10.1155/2012/548389.
- [71] L. Stanca, S.N. Petrache, A.I. Serban, A.C. Staicu, C. Sima, M.C. Munteanu, Z. Otilia, D. Dinu, A. Dinischiotu, Interaction of silicon-based quantum dots with gibel carp liver: oxidative and structural modifications, *Nanoscale Res Lett.* 8(1) (2013) 1–11. doi:10.1186/1556-276X-8-254.
- [72] K.H. Ibnaouf, S. Prasad, A. Hamdan, M. Alsalhi, A.S. Aldwayyan, M.B. Zaman, V. Masilamani, Photoluminescence spectra of CdSe/ZnS quantum dots in solution, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 121 (2014) 339–345. doi:10.1016/j.saa.2013.10.089.
- [73] H.S. Chen, P. Yang, Z.H. Khan, J.M. Wu, G. Li, A.R. Kamali, Quantum dots and nanoparticles in light emitting diodes, displays, and optoelectronic devices, *J. Nanomater.* 2015 (2015) 2–4. doi:10.1155/2015/371679.
- [74] T. Frecker, D. Bailey, X. Arzeta-Ferrer, J. McBride, S.J. Rosenthal, Review—Quantum Dots and Their Application in Lighting, Displays, and Biology, *ECS J. Solid State Sci. Technol.* 5 (2016) R3019–R3031. doi:10.1149/2.0031601jss.
- [75] M.K. Choi, J. Yang, T. Hyeon, D.-H. Kim, Flexible quantum dot light-emitting diodes for next-generation displays, *Npj Flex. Electron.* 2 (2018) 1–10. doi:10.1038/s41528-018-0023-3.
- [76] Y. Wang, R. Hu, G. Lin, I. Roy, K.-T. Yong, Functionalized quantum dots for biosensing and bioimaging and concerns on toxicity., *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 5 (2013) 2786–2799. doi:10.1021/am302030a.
- [77] K.-T. Yong, W.-C. Law, R. Hu, L. Ye, L. Liu, M.T. Swihart, P.N. Prasad, Nanotoxicity assessment of quantum dots: from cellular to primate studies., *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 1236–1250. doi:10.1039/c2cs35392j.
- [78] J.R. Roberts, J.M. Antonini, D.W. Porter, R.S. Chapman, J.F. Scabilloni, S. Young, D. Schwegler-berry, V. Castranova, R.R. Mercer, Lung toxicity and biodistribution of Cd / Se-ZnS quantum dots with different surface functional groups after pulmonary exposure in rats, *Part. Fibre Toxicol.* 10 (2013) 1–17.

- [79] M.-X. Zhao, B.-J. Zhu, The Research and Applications of Quantum Dots as Nano-Carriers for Targeted Drug Delivery and Cancer Therapy., *Nanoscale Res. Lett.* 11 (2016) 1–9. doi:10.1186/s11671-016-1394-9.
- [80] I.L. Medintz, H. Mattoussi, A.R. Clapp, Potential clinical applications of quantum dots., *Int. J. Nanomedicine.* 3 (2008) 151–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18686776%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2527673>.
- [81] H. Chen, T. Wang, K. Li, Q. He, X. Hou, R. Yang, B. Wang, Effects of surface modification of quantum dots on viability and migration of triple-negative breast cancer cells, *J. Colloid Interface Sci.* 485 (2017) 51–58. doi:10.1016/j.jcis.2016.09.024.
- [82] R. Bilan, I. Nabiev, A. Sukhanova, Quantum Dot-Based Nanotools for Bioimaging, Diagnostics, and Drug Delivery, *ChemBioChem.* 17 (2016) 2103–2114. <http://doi.wiley.com/10.1002/cbic.201600357>.
- [83] B.H. Lee, S. Suresh, A. Ekpenyong, Fluorescence intensity modulation of CdSe/ZnS quantum dots assesses reactive oxygen species during chemotherapy and radiotherapy for cancer cells, *J. Biophotonics.* (2018) 1–9. doi:10.1002/jbio.201800172.
- [84] X. Sun, X. Huang, J. Guo, W. Zhu, Y. Ding, G. Niu, A. Wang, D.O. Kiesewetter, Z.L. Wang, S. Sun, X. Chen, Self-illuminating (64)Cu-Doped CdSe/ZnS nanocrystals for in vivo tumor imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 1706–1709. doi:10.1021/ja410438n.
- [85] R. Hardman, A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 165–172. doi:10.1289/ehp.8284.
- [86] S. Ravichandran, L.J. Mortensen, L.A. Delouise, Quantification of human skin barrier function and susceptibility to quantum dot skin penetration, *Nanotoxicology.* 5 (2011) 675–686. doi:10.3109/17435390.2010.537381
- [87] M. Khoshkam, Y. Baghdadchi, R. Arezumand, A. Ramazani, Synthesis, characterization and in vivo evaluation of cadmium telluride quantum dots toxicity in mice by toxicometabolomics approach, *Toxicol. Mech. Methods.* 21 (2018) 1–8. doi:10.1080/15376516.2018.1471635.
- [88] S. Naderi, H. Zare, N. Taghavinia, A. Irajizad, M. Aghaei, M. Panjehpour, Cadmium telluride quantum dots induce apoptosis in human breast cancer cell lines, *Toxicol. Ind. Health.* 34 (2018) 339–352. doi:10.1177/0748233718763517.
- [89] A.M. Derfus, W.C.W. Chan, S.N. Bhatia, Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots, *Nano Lett.* 4 (2004) 11–18. doi:10.1021/nl0347334.

- [90] R. Rotomskis, Jurgelėnė, M. Stankevičius, M. Stankevičiūtė, N. Kazlauskienė, K. Jokšas, D. Montvydienė, V. Kulvietis, V. Karabanovas, Interaction of carboxylated CdSe/ZnS quantum dots with fish embryos: Towards understanding of nanoparticles toxicity, *Sci. Total Environ.* 635 (2018) 1280–1291. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.206.
- [91] A. Shiohara, A. Hoshino, K.-I. Hanaki, K. Suzuki, K. Yamamoto, On the cyto-toxicity caused by quantum dots., *Microbiol. Immunol.* 48 (2004) 669–675. doi: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03478.x
- [92] T.C. King-heiden, P.N. Wicinski, A.N. Mangham, K.M. Metz, D. Nesbit, J.A. Pedersen, R.J. Hamers, W. Heideman, E. Peterson, Quantum Dot Nanotoxicity Assessment Using the Zebrafish Embryo, *Env. Sci. Technol.* 43 (2010) 1605–1611.
- [93] E. Morelli, P. Cioni, M. Posarelli, E. Gabellieri, Chemical stability of CdSe quantum dots in seawater and their effects on a marine microalga., *Aquat. Toxicol.* 122–123 (2012) 153–162. doi:10.1016/j.aquatox.2012.06.012.
- [94] Y. Chen, Y. Yang, F. Ou, L. Liu, X. hong Liu, Z.J. Wang, L. Jin, InP/ZnS QDs exposure induces developmental toxicity in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 60 (2018) 28–36. doi:10.1016/j.etap.2018.04.005.
- [95] V.A. Kuznetsova, A.K. Visheratina, A. Ryan, I. V. Martynenko, A. Loudon, C.M. Maguire, F. Purcell-Milton, A.O. Orlova, A. V. Baranov, A. V. Fedorov, A. Prina-Mello, Y. Volkov, Y.K. Gun'Ko, Enantioselective cytotoxicity of ZnS:Mn quantum dots in A549 cells, *Chirality.* 29 (2017) 403–408. doi:10.1002/chir.22713.
- [96] P.B. Tchounwou, C.G. Yedjou, A.K. Patlolla, D.J. Sutton, *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 101 (2012) 133–164. doi:10.1007/978-3-7643-8340-4.
- [97] C.C. Gilmour, E.A. Henry, Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition, *Environ. Pollut.* 71 (1991) 131–169. doi:10.1016/0269-7491(91)90031-Q.
- [98] P.B. Tchounwou, W.K. Ayensu, N. Ninashvili, D. Sutton, Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health, *Environ. Toxicol.* 18 (2003) 149–175. doi:10.1002/tox.10116.
- [99] M.H. Keating, D. Beauregard, W.G. Benjey, L. Driver, W.H. Maxwell, W.D. Peters, A. Pope, Mercury Study Report to Congress Volume II: An Inventory of Anthropogenic Mercury Emissions in the United States, United States Environ. Prot. Agency. EPA-452/R- (1998) 1–181. doi:EPA-452/R-97-004.
- [100] Naciones Unidas, Convenio de Minamata sobre el Mercurio: Textos y Anexos, 2017.

- [101] P. Holmes, K.A.F. James, L.S. Levy, Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health?, *Sci. Total Environ.* 408 (2009) 171–182. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.09.043.
- [102] I. Lehnherr, Methylmercury biogeochemistry: a review with special reference to Arctic aquatic ecosystems, *Environ. Rev.* 22 (2014) 229–243. doi:10.1139/er-2013-0059.
- [103] C. Sanfeliu, J. Sebastià, R. Cristàfol, E. Rodríguez-Farré, Neurotoxicity of organomercurial compounds, *Neurotox. Res.* 5 (2003) 283–306. doi:10.1007/BF03033386.
- [104] D.E. León, G.A. Peñuela, Transcendence of methylmercury in the environment, in food and human health, *Prod. + Limpia.* 6 (2011) 108–116.
- [105] M.J. Hasni, Niigata Minamata disease: A revisit, *Malaysian J. Public Heal. Med.* 14 (2014) 47–54.
- [106] K. Maruyama, T. Yorifuji, T. Tsuda, T. Sekikawa, H. Nakadaira, H. Saito, Methyl mercury exposure at Niigata, Japan: Results of neurological examinations of 103 adults, *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (2012) 1–10. doi:10.1155/2012/635075.
- [107] S.B. Skerfving, J.F. Copplestone, Poisoning caused by the consumption of organomercury dressed seed in Iraq, *Bull. World Health Organ.* 54 (1976) 101–112.
- [108] H. Zhao, H. Yan, L. Zhang, G. Sun, P. Li, X. Feng, Mercury contents in rice and potential health risks across China, *Environ. Int.* 126 (2019) 406–412. doi:10.1016/j.envint.2019.02.055.
- [109] P. Hajeb, S. Jinap, I. Ahmad, Biomagnifications of mercury and methylmercury in tuna and mackerel, *Environ. Monit. Assess.* 171 (2010) 205–217. doi:10.1007/s10661-009-1272-3.
- [110] P. Pereira, M. Korbas, V. Pereira, T. Cappello, M. Maisano, J. Canário, A. Almeida, M. Pacheco, A multidimensional concept for mercury neuronal and sensory toxicity in fish - from toxicokinetics and biochemistry to morphometry and behavior, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* *Accept. Manuscr.* (2019). doi:10.1016/j.bbagen.2019.01.020.
- [111] G. Shanker, M. Aschner, Methylmercury-induced reactive oxygen species formation in neonatal cerebral astrocytic cultures is attenuated by antioxidants, *Mol. Brain Res.* 110 (2003) 85–91. doi:10.1016/S0169-328X(02)00642-3.
- [112] J. Watanabe, T. Nakamachi, T. Ogawa, A. Naganuma, M. Nakamura, S. Shioda, S. Nakajo, Characterization of antioxidant protection of cultured neural progenitor cells (NPC) against methylmercury (MeHg) toxicity., *J. Toxicol. Sci.* 34 (2009) 315–325. doi:10.2131/jts.34.315.
- [113] R.A. de Melo Reis, A.M. Herculano, M.C.C. da Silva, R.M. dos Santos, J.L.M. do Nascimento, In vitro toxicity induced by methylmercury on sympathetic neurons is reverted by l-cysteine or

- glutathione, *Neurosci. Res.* 58 (2007) 278–284. doi:10.1016/j.neures.2007.03.010.
- [114] N. Mori, A. Yasutake, M. Marumoto, K. Hirayama, Methylmercury inhibits electron transport chain activity and induces cytochrome c release in cerebellum mitochondria., *J. Toxicol. Sci.* 36 (2011) 253–259. doi:10.2131/jts.36.253.
- [115] M. Farina, Marcelo, Rocha, Joao B.T., Aschner, Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies, *Life Sci.* 89 (2012) 555–563. doi:10.1016/j.lfs.2011.05.019.Mechanisms.
- [116] J.D. Rasinger, A.K. Lundebye, S.J. Penglase, S. Ellingsen, H. Amlund, Methylmercury induced neurotoxicity and the influence of selenium in the brains of adult Zebrafish (*Danio rerio*), *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1–14. doi:10.3390/ijms18040725.
- [117] Y. Shao, L. Wang, P. Langlois, G. Mironov, H.M. Chan, Proteome changes in methylmercury-exposed mouse primary cerebellar granule neurons and astrocytes, *Toxicol. Vit.* 57 (2019) 96–104. doi:10.1016/j.tiv.2019.02.013.
- [118] A. Antunes dos Santos, M. Appel Hort, M. Culbreth, C. López-Granero, M. Farina, J.B.T. Rocha, M. Aschner, Methylmercury and brain development: A review of recent literature, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 38 (2016) 99–107. doi:10.1016/j.jtemb.2016.03.001.
- [119] R. Tofighi, C. Johansson, M. Goldoni, W.N.W. Ibrahim, V. Gogvadze, A. Mutti, S. Ceccatelli, Hippocampal neurons exposed to the environmental contaminants methylmercury and polychlorinated biphenyls undergo cell death via parallel activation of calpains and lysosomal proteases, *Neurotox. Res.* 19 (2011) 183–194. doi:10.1007/s12640-010-9159-1.
- [120] B.J. Shenker, T.L. Guo, I.M. Shapiro, Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: Evidence of mitochondrial dysfunction, *Environ. Res.* 77 (1998) 149–159. doi:10.1006/enrs.1997.3816.
- [121] P. Kaur, M. Aschner, T. Syversen, Role of glutathione in determining the differential sensitivity between the cortical and cerebellar regions towards mercury-induced oxidative stress, *Toxicology.* 230 (2007) 164–177. doi:10.1016/j.tox.2006.11.058.
- [122] D.W. Boening, Ecological effects, transport, and fate of mercury: A general review, *Chemosphere.* 40 (2000) 1335–1351. doi:10.1016/S0045-6535(99)00283-0.
- [123] K. Nagashima, A Review of Experimental Methylmercury Toxicity in Rats: Neuropathology and Evidence for Apoptosis, *Toxicol. Pathol.* 25 (1997) 624–631. doi:10.1177/019262339702500613.

- [124] K. Sokolowski, A. Falluel-Morel, X. Zhou, E. DiCicco-Bloom, Methylmercury (MeHg) elicits mitochondrial-dependent apoptosis in developing hippocampus and acts at low exposures, *Neurotoxicology*. 32 (2011) 535–544. doi:10.1016/j.neuro.2011.06.003.
- [125] H. Estevez, J.C. Garcia-Lidon, C. Camara, J.L. Luque-Garcia, Effects of chitosan-modified selenium nanoparticles on cell proliferation, apoptosis and cell cycle pattern in HepG2 cells: Comparison with other selenospecies, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 122 (2014) 184–193. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.06.062.
- [126] S.A.R. Sakr, H.A. hafez Mahran, A.E. Nofal, Effect of selenium on carbimazole-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25 (2011) 59–66. doi:10.1016/j.jtemb.2010.07.002.
- [127] C. Thirunavukkarasu, D. Sakthisekaran, Sodium selenite, dietary micronutrient, prevents the lymphocyte DNA damage induced by N-nitrosodiethylamine and phenobarbital promoted experimental hepatocarcinogenesis, *J. Cell. Biochem.* 88 (2003) 578–588. doi:10.1002/jcb.10362.
- [128] C. Méplan, I.T. Johnson, A.C.J. Polley, S. Cockell, D.M. Bradburn, D.M. Commane, R.P. Arasaradnam, F. Mulholland, A. Zupanic, J.C. Mathers, J. Hesketh, Transcriptomics and proteomics show that selenium affects inflammation, cytoskeleton, and cancer pathways in human rectal biopsies, *FASEB J.* 30 (2016) 2812–2825. doi:10.1096/fj.201600251R.
- [129] J.L. Luque-Garcia, P. Cabezas-Sanchez, D.S. Anunciação, C. Camara, Analytical and bioanalytical approaches to unravel the selenium-mercury antagonism: A review, *Anal. Chim. Acta.* 801 (2013) 1–13. doi:10.1016/j.aca.2013.08.043.
- [130] M.N. Reed, E.M. Paletz, M.C. Newland, Gestational Exposure to Methylmercury and Selenium: Effects on a Spatial Discrimination Reversal in Adulthood, *Neurotoxicology*. 27 (2006) 721–732. doi:10.1016/j.neuro.2006.03.022.
- [131] N.V.C. Ralston, L.J. Raymond, Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity, *Toxicology*. 278 (2010) 112–123. doi:10.1016/j.tox.2010.06.004.
- [132] M.A. García-Sevillano, G. Rodríguez-Moro, T. García-Barrera, F. Navarro, J.L. Gómez-Ariza, Biological interactions between mercury and selenium in distribution and detoxification processes in mice under controlled exposure. Effects on selenoprotein, *Chem. Biol. Interact.* 229 (2015) 82–90. doi:10.1016/j.cbi.2015.02.001.
- [133] Y. Sugiura, Y. Tamai, H. Tanaka, Selenium protection against mercury toxicity: high binding affinity of methylmercury by selenium-containing ligands in comparison with sulfur-containing

- ligands, *Bioinorg. Chem.* 9 (1978) 167–180. doi:10.1016/S0006-3061(00)80288-4.
- [134] S. Penglase, K. Hamre, S. Ellingsen, Selenium prevents downregulation of antioxidant selenoprotein genes by methylmercury, *Free Radic. Biol. Med.* 75 (2014) 95–104. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.019.
- [135] L. Su, M. Wang, S.T. Yin, H.L. Wang, L. Chen, L.G. Sun, D.Y. Ruan, The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70 (2008) 483–489. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.05.018.
- [136] S. Skerfving, Interaction between selenium and methylmercury, *Environ. Health Perspect.* 25 (1978) 57–65. doi:10.1289/ehp.782557.
- [137] Y. Wang, F. Dang, R.D. Evans, H. Zhong, J. Zhao, D. Zhou, Mechanistic understanding of MeHg-Se antagonism in soil-rice systems: the key role of antagonism in soil, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–11. doi:10.1038/srep19477.
- [138] X. Wang, W.X. Wang, Selenium induces the demethylation of mercury in marine fish, *Environ. Pollut.* 231 (2017) 1543–1551. doi:10.1016/j.envpol.2017.09.014.
- [139] E. Olkowska, M. Ruman, Z. Polkowska, Occurrence of surface active agents in the environment, *J. Anal. Methods Chem.* 2014 (2014) 1–15. doi:10.1155/2014/769708.
- [140] M. Lechuga, M. Fernández-Serrano, E. Jurado, J. Núñez-Olea, F. Ríos, Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 125 (2016) 1–8. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.11.027.
- [141] E. Lémery, S. Briançon, Y. Chevalier, C. Bordes, T. Oddos, A. Gohier, M.A. Bolzinger, Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 469 (2015) 166–179. doi:10.1016/j.colsurfa.2015.01.019.
- [142] N.V.I. Salvadó, V. V Shah, D. a Werkema, Surfactants in pressure sensitive adhesives, *Surf. Coatings Int.* 82 (1999) 181–185. doi:10.1007/BF02720115.
- [143] L. Dsikowitzky, O. Botalova, S. Illgut, S. Bosowski, J. Schwarzbauer, Identification of characteristic organic contaminants in wastewaters from modern paper production sites and subsequent tracing in a river, *J. Hazard. Mater.* 300 (2015) 254–262. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.07.001.
- [144] K. Vincze, M. Gehring, T. Braunbeck, (Eco)toxicological effects of 2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol (TMDD) in zebrafish (*Danio rerio*) and permanent fish cell cultures, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 8233–8241. doi:10.1007/s11356-014-2806-y.

- [145] R. Kroes, C. Galli, I. Munro, B. Schilter, L.A. Tran, R. Walker, G. Würtzen, Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: A practical tool for assessing the need for toxicity testing, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 255–312. doi:10.1016/S0278-6915(99)00120-9.
- [146] S.J. More, V. Bampidis, D. Benford, C. Bragard, T.I. Halldorsson, A.F. Hernández-Jerez, S. Hougaard Bennekou, K.P. Koutsoumanis, K. Machera, H. Naegeli, S.S. Nielsen, J.R. Schlatter, D. Schrenk, V. Silano, D. Turck, M. Younes, U. Gundert-Remy, G.E.N. Kass, J. Kleiner, A.M. Rossi, R. Serafimova, L. Reilly, H.M. Wallace, Guidance on the use of the Threshold of Toxicological Concern approach in food safety assessment, *EFSA J.* 17 (2019). doi:10.2903/j.efsa.2019.5708.
- [147] E. Canellas, M. Aznar, C. Nerín, P. Mercea, Partition and diffusion of volatile compounds from acrylic adhesives used for food packaging multilayers manufacturing, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 5100–5109. doi:10.1039/c0jm00514b.
- [148] C. Nerín, J.L. Úbeda, P. Alfaro, Y. Dahmani, M. Aznar, E. Canellas, R. Ausejo, Compounds from multilayer plastic bags cause reproductive failures in artificial insemination, *Sci. Rep.* 4 (2014) 1–10. doi:10.1038/srep04913.
- [149] F. Isella, E. Canellas, O. Bosetti, C. Nerín, Migration of non intentionally added substances from adhesives by UPLC-Q-TOF/MS and the role of EVOH to avoid migration in multilayer packaging materials, *J. Mass Spectrom.* 48 (2013) 430–437. doi:10.1002/jms.3165.
- [150] E. Canellas, P. Vera, C. Nerín, Risk assessment derived from migrants identified in several adhesives commonly used in food contact materials, *Food Chem. Toxicol.* 75 (2015) 79–87. doi:10.1016/j.fct.2014.10.029.
- [151] S. Zarco-Fernández, A.M. Coto-García, R. Muñoz-Olivas, J. Sanz-Landaluze, S. Rainieri, C. Cámara, Bioconcentration of ionic cadmium and cadmium selenide quantum dots in zebrafish larvae, *Chemosphere.* 148 (2016) 328–335. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.12.077.
- [152] M.P. Papadimitropoulos, C.G. Vasilopoulou, C. Maga-nteve, M.I. Klapa, Untargeted GC-MS Metabolomics, in: *Methods Mol. Biol.*, Springer Nature 2018, 2018: pp. 133–147. doi:10.1007/978-1-4939-7643-0.
- [153] A. Maertens, M. Bouhifd, L. Zhao, S. Odwin-DaCosta, A. Kleensang, J.D. Yager, T. Hartung, Metabolomic network analysis of estrogen-stimulated MCF-7 cells: a comparison of overrepresentation analysis, quantitative enrichment analysis and pathway analysis versus metabolite network analysis, *Arch. Toxicol.* 91 (2017) 217–230. doi:10.1007/s00204-016-1695-x.
- [154] W. Lu, L. Wang, L. Chen, S. Hui, J.D. Rabinowitz, Extraction and quantitation of NAD(P)(H),

- Antioxid. Redox Signal. 28 (2017) 167–179. doi:10.1089/ars.2017.7014.
- [155] J. Li, X. Chang, X. Chen, Z. Gu, F. Zhao, Z. Chai, Y. Zhao, Toxicity of inorganic nanomaterials in biomedical imaging., *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 727–743. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.12.009.
- [156] L. Paesano, A. Perotti, A. Buschini, C. Carubbi, M. Marmiroli, E. Maestri, S. Iannotta, N. Marmiroli, Markers for toxicity to HepG2 exposed to cadmium sulphide quantum dots; damage to mitochondria, *Toxicology*. 374 (2016) 18–28. doi:10.1016/j.tox.2016.11.012.
- [157] L. Lai, Y.-P. Li, P. Mei, W. Chen, F.-L. Jiang, Y. Liu, Size Effects on the Interaction of QDs with the Mitochondrial Membrane In Vitro, *J. Membr. Biol.* 249 (2016) 757–767. doi:10.1007/s00232-016-9920-3.
- [158] B. Kar, Zebrafish: An in Vivo Model for the Study of Human Diseases, *Int. J. Genet. Genomics*. 1 (2013) 6. doi:10.11648/j.ijgg.20130101.12.
- [159] L.I. Zon, R.T. Peterson, In vivo drug discovery in the zebrafish, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 35–44. doi:10.1038/nrd1606.
- [160] G. Kari, U. Rodeck, A.P. Dicker, Zebrafish: An emerging model system for human disease and drug discovery, *Clin. Pharmacol. Ther.* 82 (2007) 70–80. doi:10.1038/sj.clpt.6100223.
- [161] G.H. Jang, M.P. Hwang, S.Y. Kim, H.S. Jang, K.H. Lee, A systematic in-vivo toxicity evaluation of nanophosphor particles via zebrafish models., *Biomaterials*. 35 (2014) 440–9. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.054.
- [162] R.O. Adu, J.P. Thomsen, Improving Production of Zebra Fish Embryos in the Lab, *J. Environ. Prot. (Irvine, Calif.)*. 02 (2011) 1360–1363. doi:10.4236/jep.2011.210157.
- [163] R.T. Peterson, C.A. MacRae, Systematic approaches to toxicology in the zebrafish, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52 (2012) 433–453. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134751.
- [164] S. Cuello, P. Ximénez-Embun, I. Ruppen, H.B. Schonthaler, K. Ashman, Y. Madrid, J.L. Luque-Garcia, C. Cámara, Analysis of protein expression in developmental toxicity induced by MeHg in zebrafish, *Analyst*. 137 (2012) 5302–5311. doi:10.1039/c2an35913h.
- [165] L.W. Zhang, N.A. Monteiro-Riviere, Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake., *Toxicol. Sci.* 110 (2009) 138–155. doi:10.1093/toxsci/kfp087.
- [166] Y. Wada, Vacuoles in mammals: a subcellular structure indispensable for early embryogenesis., *Bioarchitecture*. 3 (2013) 13–19. doi:10.4161/bioa.24126.

- [167] M.A. Aon, S. Cortassa, Function of metabolic and organelle networks in crowded and organized media., *Front. Physiol.* 5 (2015) 1–10. doi:10.3389/fphys.2014.00523.
- [168] M.P. Murphy, R.M. Siegel, Mitochondrial ROS Fire Up T Cell Activation, *Immunity.* 38 (2013) 201–202. doi:10.1016/j.immuni.2013.02.005.
- [169] N.E. Sunny, E.J. Parks, J.D. Browning, S.C. Burgess, Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease., *Cell Metab.* 14 (2011) 804–810. doi:10.1016/j.cmet.2011.11.004.
- [170] D. Degli Esposti, J. Hamelin, N. Bosselut, R. Saffroy, M. Sebah, A. Pommier, C. Martel, A. Lemoine, Mitochondrial roles and cytoprotection in chronic liver injury., *Biochem. Res. Int.* 2012 (2012) 1–16. doi:10.1155/2012/387626.
- [171] N. a Osna, R.L. White, V.M. Krutik, T. Wang, S. a Weinman, T.M. Donohue, Proteasome activation by hepatitis C core protein is reversed by ethanol-induced oxidative stress., *Gastroenterology.* 134 (2008) 2144–2152. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.063.
- [172] Y. Son, Y.-K. Cheong, N.-H. Kim, H.-T. Chung, D.G. Kang, H.-O. Pae, Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?, *J. Signal Transduct.* 2011 (2011) 1–6. doi:10.1155/2011/792639.
- [173] R.B. Hamanaka, N.S. Chandel, Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling Robert, *J. Exp. Biol.* 21 (2010) 894–899. doi:10.1016/j.ceb.2009.08.005.Mitochondrial.
- [174] K. Tsui, L. Chung, S. Wang, T. Feng, Hypoxia upregulates the gene expression of mitochondrial aconitase in prostate carcinoma cells, *J. Mol. Endocrinol.* 51 (2013) 131–141. doi:10.1530/JME-13-0090.
- [175] K.K. Graven, C. Molvar, J.S. Roncarati, B.D. Klahn, S. Lowrey, H.W. Farber, Identification of protein disulfide isomerase as an endothelial hypoxic stress protein., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 282 (2002) L996–L1003. doi:10.1152/ajplung.00359.2001.
- [176] G. Li, D. Ma, Y. Chen, Cellular functions of programmed cell death 5, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863 (2016) 572–580. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.12.021.
- [177] P. Li, H. Fei, L. Wang, H. Xu, H. Zhang, L. Zheng, Pcd5 regulates cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis, *Oncol. Lett.* 15 (2018) 1177–1183. doi:10.3892/ol.2017.7401.
- [178] V. Shoshan-Barmatz, V. De Pinto, M. Zweckstetter, Z. Raviv, N. Keinan, N. Arbel, VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death, *Mol. Aspects Med.* 31 (2010) 227–285. doi:10.1016/j.mam.2010.03.002.

- [179] B.G. Hoffstrom, A. Kaplan, R. Letso, R.S. Schmid, G.J. Turmel, D.C. Lo, B.R. Stockwell, Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins, *Nat. Chem. Biol.* 6 (2010) 900–906. doi:10.1038/nchembio.467.
- [180] S. Bin Wang, Q. Shi, Y. Xu, W.L. Xie, J. Zhang, C. Tian, Y. Guo, K. Wang, B.Y. Zhang, C. Chen, C. Gao, X.P. Dong, Protein disulfide isomerase regulates endoplasmic reticulum stress and the apoptotic process during prion infection and PrP mutant-induced cytotoxicity, *PLoS One.* 7 (2012) 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0038221.
- [181] S. Ping, S. Liu, Y. Zhou, Z. Li, Y. Li, K. Liu, A.S. Bardeesi, L. Wang, J. Chen, L. Deng, J. Wang, H. Wang, D. Chen, Z. Zhang, P. Sheng, C. Li, Protein disulfide isomerase-mediated apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells induced by mechanical stress and advanced glycosylation end products result in diabetic mouse vein graft atherosclerosis, *Cell Death Dis.* 8 (2017) 1–15. doi:10.1038/cddis.2017.213.
- [182] T.J. Cohen, A.W. Hwang, T. Unger, J.Q. Trojanowski, V.M.Y. Lee, Redox signalling directly regulates TDP-43 via cysteine oxidation and disulphide cross-linking, *EMBO J.* 31 (2011) 1241–1252. doi:10.1038/emboj.2011.471.
- [183] E. Buratti, F.E. Baralle, TDP-43: gumming up neurons through protein-protein and protein-RNA interactions., *Trends Biochem. Sci.* 37 (2012) 237–247. doi:10.1016/j.tibs.2012.03.003.
- [184] R.J. Braun, C. Sommer, D. Carmona-Gutierrez, C.M. Khoury, J. Ring, S. Büttner, F. Madeo, Neurotoxic 43-kDa TAR DNA-binding protein (TDP-43) triggers mitochondrion-dependent programmed cell death in yeast., *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 19958–19972. doi:10.1074/jbc.M110.194852.
- [185] J. Meyerowitz, S.J. Parker, L.J. Vella, D.C. Ng, K. a Price, J.R. Liddell, A. Caragounis, Q.-X. Li, C.L. Masters, T. Nonaka, M. Hasegawa, M. a Bogoyevitch, K.M. Kanninen, P.J. Crouch, A.R. White, C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress., *Mol. Neurodegener.* 6 (2011) 1–22. doi:10.1186/1750-1326-6-57.
- [186] L. Chen, C. Huang, C. Hu, K. Yu, L. Yang, B. Zhou, Acute exposure to DE-71: Effects on locomotor behavior and developmental neurotoxicity in zebrafish larvae, *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2012) 2338–2344. doi:10.1002/etc.1958.
- [187] L. Sun, H. Tan, T. Peng, S. Wang, W. Xu, H. Qian, Y. Jin, Z. Fu, Developmental neurotoxicity of organophosphate flame retardants in early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (2016) 2931–2940. doi:10.1002/etc.3477.
- [188] H. Nord, A.-C. Burguiere, J. Muck, C. Nord, U. Ahlgren, J. von Hofsten, Differential regulation of

- myosin heavy chains defines new muscle domains in zebrafish, *Mol. Biol. Cell.* 25 (2014) 1384–1395. doi:10.1091/mbc.E13-08-0486.
- [189] A. Burgess, K. Shah, O. Hough, K. Hynynen, Myo1c is an unconventional myosin required for zebrafish glomerular development Ehtesham, *Kidney Int.* 15 (2016) 477–491. doi:10.1038/ki.2013.201.
- [190] P. Gupta, R. Martin, H.J. Knölker, D. Nihalani, D.K. Sinha, Myosin-1 inhibition by PCIP affects membrane shape, cortical actin distribution and lipid droplet dynamics in early Zebrafish embryos, *PLoS One.* 12 (2017) 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0180301.
- [191] R. Wagener, H.W.A. Ehlen, Y.P. Ko, B. Kobbe, H.H. Mann, G. Sengle, M. Paulsson, The matrilins - Adaptor proteins in the extracellular matrix, *FEBS Lett.* 579 (2005) 3323–3329. doi:10.1016/j.febslet.2005.03.018.
- [192] D. Wehner, T.M. Tsarouchas, A. Michael, C. Haase, G. Weidinger, M.M. Reimer, T. Becker, C.G. Becker, Wnt signaling controls pro-regenerative Collagen XII in functional spinal cord regeneration in zebrafish, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1–16. doi:10.1038/s41467-017-00143-0.
- [193] J.R. Jessen, Recent advances in the study of zebrafish extracellular matrix proteins, *Dev. Biol.* 401 (2015) 110–121. doi:10.1016/j.ydbio.2014.12.022.
- [194] L.M. Watson, A.K.C. Chan, L.R. Berry, J. Lit, S.K. Sood, J.G. Dickhout, L. Xu, G.H. Werstuck, L. Bajzar, H.J. Klamut, R.C. Austin, Overexpression of the 78-kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin-binding protein (GRP78/BiP) inhibits tissue factor procoagulant activity, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 17438–17447. doi:10.1074/jbc.M301006200.
- [195] Z. Zhang, Y. Wang, C. Li, Z. Shi, Q. Hao, W. Wang, X. Song, Y. Zhao, S. Jiao, Z. Zhou, The transitional endoplasmic reticulum ATPase p97 regulates the alternative nuclear factor NF-κB signaling via partial degradation of the NF-κB subunit p100, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 19558–19568. doi:10.1074/jbc.M114.630061.
- [196] N. Stafford, C. Wilson, D. Oceandy, L. Neyses, E.J. Cartwright, The Plasma Membrane Calcium ATPases and Their Role as Major New Players in Human Disease, *Physiol. Rev.* 97 (2017) 1089–1125. doi:10.1152/physrev.00028.2016.
- [197] C.H. Lin, P.P. Hwang, The control of calcium metabolism in zebrafish (*Danio rerio*), *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 1–16. doi:10.3390/ijms17111783.
- [198] N. Vydra, E. Malusecka, M. Jarzab, K. Lisowska, M. Glowala-Kosinska, K. Benedyk, P. Widlak, Z. Krawczyk, W. Widlak, Spermatocyte-specific expression of constitutively active heat shock factor 1 induces HSP70i-resistant apoptosis in male germ cells., *Cell Death Differ.* 13 (2006) 212–222.

doi:10.1038/sj.cdd.4401758.

- [199] C.L. Wu, T.H. Lin, T.L. Chang, H.W. Sun, C.F. Hui, J.L. Wu, Zebrafish HSC70 promoter to express carp muscle-specific creatine kinase for acclimation under cold condition, *Transgenic Res.* 20 (2011) 1217–1226. doi:10.1007/s11248-011-9488-8.
- [200] T. Dickmeis, S. Rastegar, P. Aanstad, M. Clark, N. Fischer, C. Plessy, F. Rosa, V. Korzh, U. Strähle, Expression of brain subtype creatine kinase in the zebrafish embryo, *Mech. Dev.* 109 (2001) 409–412. doi:10.1016/S0925-4773(01)00536-6.
- [201] A. Estepa, J. Coll, Inhibition of SERPINE1 reduces rhabdoviral infections in zebrafish, *Fish Shellfish Immunol.* 47 (2015) 264–270. doi:10.1016/j.fsi.2015.09.017.
- [202] S. Gottschalk, T.S. Chan, S. Cassim, C. Zwingmann, P. Lapierre, P. Darby, D. Mazer, M. Bilodeau, Upregulation of Krebs cycle and anaerobic glycolysis activity early after onset of liver ischemia, *PLoS One.* 13 (2018) 1–17. doi:10.1371/journal.pone.019917.
- [203] N.B. Bennette, J.F. Eng, G.C. Dismukes, An LC-MS-Based Chemical and Analytical Method for Targeted, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3808–3816. doi:10.1021/ac200108a.
- [204] J.L. Sporty, M. Kabir, K.W. Turteltaub, T. Ognibene, G. Bench, Single sample extraction protocol for the quantification of NAD and NADH redox states in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Sep. Sci.* 31 (2009) 3202–3211. doi:10.1002/jssc.200800238.Single.
- [205] S.U. Bajad, W. Lu, E.H. Kimball, J. Yuan, C. Peterson, J.D. Rabinowitz, Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1125 (2006) 76–88. doi:10.1016/j.chroma.2006.05.019.
- [206] L. Guo, A.J. Worth, C. Mesaros, N.W. Snyder, J.D. Glickson, I.A. Blair, Diisopropylethylamine/hexafluoroisopropanol-mediated ion-pairing ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry for phosphate and carboxylate metabolite analysis: utility for studying cellular metabolism, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30 (2016) 1835–1845. doi:10.1002/rcm.7667.
- [207] W. Lu, M.F. Clasquin, E. Melamud, D. Amador-Noguez, A.A. Caudy, J.D. Rabinowitz, Metabolomic analysis via reversed-phase ion-pairing liquid chromatography coupled to a stand alone orbitrap mass spectrometer, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3212–3221. doi:10.1021/ac902837x.
- [208] C. Zhang, Z. Liu, X. Liu, L. Wei, Y. Liu, J. Yu, Targeted metabolic analysis of nucleotides and identification of biomarkers associated with cancer in cultured cell models, *Acta Pharm. Sin. B.* 3 (2013) 254–262. doi:10.1016/j.apsb.2013.06.002.

- [209] C.T. Tiernan, E.A. Edwin, H.Y. Hawong, M. Ríos-Cabanillas, J.L. Goudreau, W.D. Atchison, K.J. Lookingland, Methylmercury impairs canonical dopamine metabolism in rat undifferentiated pheochromocytoma (pc12) cells by indirect inhibition of aldehyde dehydrogenase, *Toxicol. Sci.* 144 (2015) 347–356. doi:10.1093/toxsci/kfv001.
- [210] S. Cambier, G. Bénard, N. Mesmer-Dudons, P. Gonzalez, R. Rossignol, D. Brèthes, J.P. Bourdineaud, At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*), *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 791–799. doi:10.1016/j.biocel.2008.08.008.
- [211] X. Wang, M. Yan, L. Zhao, Q. Wu, C. Wu, X. Chang, Z. Zhou, Low-Dose Methylmercury-Induced Apoptosis and Mitochondrial DNA Mutation in Human Embryonic Neural Progenitor Cells, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016 (2016) 1–10. doi:10.1155/2016/5137042.
- [212] S.H. Al-Lahham, M.P. Peppelenbosch, H. Roelofsen, R.J. Vonk, K. Venema, Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta.* 1801 (2010) 1175–1183. doi:10.1016/j.bbalip.2010.07.007.
- [213] C.N. Gallagher, K.L.H. Carpenter, P. Grice, D.J. Howe, A. Mason, I. Timofeev, D.K. Menon, P.J. Kirkpatrick, J.D. Pickard, G.R. Sutherland, P.J. Hutchinson, The human brain utilizes lactate via the tricarboxylic acid cycle: a ¹³C-labelled microdialysis and high-resolution nuclear magnetic resonance study, *Brain.* 132 (2009) 2839–2849. doi:10.1093/brain/awp202.
- [214] A.M. Umpleby, I.N. Scobie, M.A. Boroujerdi, P.H. Sönksen, The effect of starvation on leucine, alanine and glucose metabolism in obese subjects, *Eur. J. Clin. Invest.* 25 (1995) 619–626. doi:10.1111/j.1365-2362.1995.tb01755.x.
- [215] J. Albrecht, U. Sonnewald, H.S. Waagepetersen, A. Schousboe, Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction., *Front. Biosci.* 12 (2007) 332–343. doi:10.2741/2067.
- [216] J.T. Cole, Metabolism of BCAAs, in: *Branched Chain Amin. Acids Clin. Nutr.* 13 Vol. 1, Nutr. Heal., 2015: pp. 13–25. doi:10.1007/978-1-4939-1923-9.
- [217] M. Ni, X. Li, Z. Yin, H. Jiang, M. Sidoryk-Wegrzynowicz, D. Milatovic, J. Cai, M. Aschner, Methylmercury induces acute oxidative stress, altering Nrf2 protein level in primary microglial cells, *Toxicol. Sci.* 116 (2010) 590–603. doi:10.1093/toxsci/kfq126.
- [218] R.A. Paterson, D.R. Usher, Acute toxicity of methyl mercury on glycolytic intermediates and adenine nucleotides of rat brain, *Life Sci.* 10 (1971) 121–128. doi:10.1016/0024-3205(71)90024-5.
- [219] L.R. Feksa, A. Renata Cornelio, C. Regla Vargas, A. Terezinha de Souza Wyse, C. Severo Dutra-

- Filho, M. Wajner, C.M. Duval Wannmacher, Alanine Prevents the Inhibition of Pyruvate Kinase Activity Caused by Tryptophan in Cerebral Cortex of Rats, *Metab. Brain Dis.* 18 (2003) 129–137. doi:10.1023/A:1023811019023 .
- [220] J. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, Entry to the Citric Acid Cycle and Metabolism Through It Are Controlled Regulated Allosterically and by Reversible, in: *Biochem.* 5th Ed., W. H. Freeman and Company, 2002.
- [221] R.F. Lodato, R.J. Smith, D. Valle, J.M. Phang, T.T. Aoki, Regulation of Proline Biosynthesis: Carboxylate Synthase The Inhibition of Pyrroline-5- Activity by Ornithine, *Metabolism.* 30 (1981) 908–913.
- [222] R. Bujak, J. Mateo, I. Blanco, J.L. Izquierdo-García, D. Dudzik, M.J. Markuszewski, V.I. Peinado, M. Laclaustra, J.A. Barberá, C. Barbas, J. Ruiz-Cabello, New biochemical insights into the mechanisms of pulmonary arterial hypertension in humans, *PLoS One.* 11 (2016) 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0160505.
- [223] S. Gupta, A.G. Knight, S. Gupta, J.N. Keller, A.J.B.- Keller, Saturated Long Chain Fatty acids Activate Inflammatory Signaling in Astrocytes, *J Neurochem.* 120 (2012) 1060–1071. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07660.x.Saturated.
- [224] S.J. Kim, W.S. Chung, S.S. Kim, S.G. Ko, J.Y. Um, Antiinflammatory effect of Oldenlandia diffusa and its constituent, hentriacontane, through suppression of caspase-1 activation in mouse peritoneal macrophages, *Phyther. Res.* 25 (2011) 1537–1546. doi:10.1002/ptr.3443.
- [225] A.M. Turpeinen, M. Mutanen, A. Aro, I. Salminen, S. Basu, D.L. Palmquist, J.M. Griinari, Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 76 (2002) 504–510. doi:10.1093/ajcn/76.3.504.
- [226] S.C.S. Nagamani, A. Erez, A metabolic link between the urea cycle and cancer cell proliferation, *Mol. Cell. Oncol.* 3 (2016) 1–3. doi:10.1080/23723556.2015.1127314.
- [227] G.P. Bijvoet, C.J.M. van der Sijs-Bos, J.P.M. Wielders, O.A. Groot, Fatal hyperammonaemia due to late-onset ornithine transcarbamylase deficiency, *Neth. J. Med.* 74 (2016) 36–39.
- [228] R.R. Handley, S.J. Reid, R. Brauning, P. Maclean, E.R. Mears, I. Fourie, S. Patassini, G.J.S. Cooper, S.R. Rudiger, C.J. McLaughlan, P.J. Verma, J.F. Gusella, M.E. MacDonald, H.J. Waldvogel, C.S. Bawden, R.L.M. Faull, R.G. Snell, Brain urea increase is an early Huntington’s disease pathogenic event observed in a prodromal transgenic sheep model and HD cases, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114 (2017) E11293–E11302. doi:10.1073/pnas.1711243115.
- [229] National Research Council, Risk Characterization and Public Health Implications, in: *Toxicol. Eff.*

- Methylmercury, National Academies Press, 2000: pp. 304–332.
- [230] A.W. Rodwell, A. Abbot, The Function of Glycerol, Cholesterol and Long -Chain Fatty Acids in the Nutrition of *Mycoplasma mycoides*, *J. Gen. Microbiol.* 25 (1961) 201–214.
- [231] R.C. Burghardt, G. a Johnson, Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition, *Amino Acids.* 40 (2013) 1053–1063. doi:10.1007/s00726-010-0715-z.Proline.
- [232] R. Kibe, S. Kurihara, Y. Sakai, H. Suzuki, T. Ooga, E. Sawaki, K. Muramatsu, A. Nakamura, A. Yamashita, Y. Kitada, M. Takeyama, Y. Benno, M. Matsumoto, Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice, *Sci. Rep.* 4 (2014) 1–11. doi:10.1038/srep04548.
- [233] H.J. Thompson, C. Ip, H.E. Ganther, Changes in ornithine decarboxylase activity and polyamine levels in response to eight different forms of selenium, *J. Inorg. Biochem.* 44 (1991) 283–292. doi:10.1016/0162-0134(91)84034-7.
- [234] C.Y. Cheng, Molecular mechanisms in spermatogenesis, 2008. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [235] J.J. Cosson, ATP , The sperm movement energizer, in: Adenosine Triphosphate Chem. Prop. Biosynthesis Funct. Cells. Nov. Publ. Inc., 2012: pp. 1–46.
- [236] I. Virtanen, R.A. Badley, R. Paasivuo, V.P. Lehto, Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells, *J. Cell Biol.* 99 (1984) 1083–1091. doi:10.1083/jcb.99.3.1083.
- [237] X. Xiang, Y. Wan-xi, Actin-based dynamics during spermatogenesis and its significance, *J. Zhejuang University Sci. B.* 8 (2007) 498–506. doi:10.1631/jzus.2007.B0498.
- [238] X. Fu, S. Cheng, L. Wang, S. Yin, M. De Felici, W. Shen, DAZ Family Proteins, Key Players for Germ Cell Development, *Int. J. Biol. Sci.* 11 (2015) 1226–1235. doi:10.7150/ijbs.11536.
- [239] T. Kuroda, H. Tanaka, H. Nakamura, Y. Nishimune, T. Kishimoto, Hepatoma-derived growth factor-related protein (HRP)-1 gene in spermatogenesis in mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262 (1999) 433–437. doi:10.1006/bbrc.1999.1115.
- [240] N.J. Lennon, A. Kho, B.J. Bacskaï, S.L. Perlmutter, B.T. Hyman, R.H.B. Jr, Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing, *Am. Soc. Biochem. Mol. Biol.* 278 (2003) 50466–50473. doi:10.1074/jbc.M307247200.
- [241] A. Kaetzel, Differential localization of annexins in ram germ cells: a biochemical and

- immunocytochemical study, *J. Histochem. Cytochem.* 39 (1991) 955–963.
- [242] C. De Jonge, C. Barratt, *The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, 2006.
- [243] V. Esmaeili, A.H. Shahverdi, M.H. Moghadasian, A.R. Alizadeh, Dietary fatty acids affect semen quality: a review, *Andrology*. 3 (2015) 450–461. doi:10.1111/andr.12024.
- [244] D. Stewart Robertson, The function of oxalic acid in the human metabolism., *Clin. Chem. Lab. Med.* 49 (2011) 1405–1412. doi:10.1515/CCLM.2011.238.
- [245] B.A.M. and H. Ashiharab, Purine and Pyrimidine Nucleotide Metabolism, *Arab. Book. Am. Soc. Plant Biol.* 1 (2002) 1–20. doi:10.1016/S0076-6879(78)51070-7.
- [246] R.A. Condorelli, S. Lavignera, F. Di Bari, V. Unfer, A.E. Calogero, Effects of myoinositol on sperm mitochondrial function in-vitro, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 15 (2011) 129–134.
- [247] A.E. Calogero, G. Gullo, S. La Vignera, R.A. Condorelli, A. Vaiarelli, Myoinositol improves sperm parameters and serum reproductive hormones in patients with idiopathic infertility: A prospective double-blind randomized placebo-controlled study, *Andrology*. 3 (2015) 491–495. doi:10.1111/andr.12025.
- [248] G. Carlomagno, M. Nordio, T.T. Chiu, V. Unfer, Contribution of myo-inositol and melatonin to human reproduction, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 159 (2011) 267–272. doi:10.1016/j.ejogrb.2011.07.038.
- [249] M. Tourmente, E.R.S. Roldan, Mass-specific metabolic rate influences sperm performance through energy production in mammals, *PLoS One*. 10 (2015) 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0138185.
- [250] I.R. Gibbons, M.P. Cosson, J. a Evans, B.H. Gibbons, B. Houck, K.H. Martinson, W.S. Sale, W.J. Tang, Potent inhibition of dynein adenosinetriphosphatase and of the motility of cilia and sperm flagella by vanadate., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75 (1978) 2220–4. doi:10.1073/pnas.75.5.2220
- [251] R.K. Naz, Involvement of protein serine and threonine phosphorylation in human sperm capacitation., *Biol. Reprod.* 60 (1999) 1402–1409. doi:10.1095/biolreprod60.6.1402.
- [252] N.H.P.M. Jutte, R. Jansen, J.A. Grootegoed, F.F. Rommerts, H.J. van der Molen, FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis, *J. Reprod. Fertil.* 68 (1983) 219–226. doi: 10.1530/jrf.0.0680219
- [253] K. Erkkilä, H. Aito, K. Aalto, V. Pentikäinen, L. Dunkel, Lactate inhibits germ cell apoptosis in the human testis., *Mol. Hum. Reprod.* 8 (2002) 109–117.

- [254] E. Rozengurt, L. Jimi, N.E.Z.D.E. Asua, H. Carminatti, Allosteric inhibition of muscle pyruvate kinase by phenylalanine, *FEBS Lett.* 11 (1970) 284–286.
- [255] M.L.G. Rato, S. Alves, J.E. Socorro, P.F. Cavaco, J. Oliveira, P.F. Oliveira, L. Rato, M.G. Alves, S. Socorro, A.I. Duarte, J.E. Cavaco, P.F. Oliveira, Metabolic regulation is important for spermatogenesis, *Nat. Rev. Urol.* 9 (2012) 330–33877. doi:10.1038/nrurol.2012.77.
- [256] Y. Han, C.J. Haines, H.L. Feng, Role(s) of the serine/threonine protein phosphatase 1 on mammalian sperm motility., *Arch. Androl.* 53 (2007) 169–77. doi:10.1080/01485010701314032.
- [257] J.C. Yang, F. a Loewus, Metabolic Conversion of L-Ascorbic Acid to Oxalic Acid in Oxalate-accumulating Plants, *Plant Physiol.* 56 (1975) 283–285. doi:10.1104/pp.56.2.283.
- [258] Q.T. Nguyen, U. Wallner, M. Schmicke, D. Waberski, H. Henning, Energy metabolic state in hypothermically stored boar spermatozoa using a revised protocol for efficient ATP extraction, *Biol. Open.* 5 (2016) 1743–1751. doi:10.1242/bio.017954.
- [259] W. Ying, Cell Death : Regulation and Biological Consequences, *Antioxidants Redox Signal.* 10 (2008). doi:10.1089/ars.2007.1672.
- [260] K. Kinnula, K. Linnainmaa, K.O. Raivio, V.L. Kinnula, Endogenous antioxidant enzymes and glutathione S-transferase in protection of mesothelioma cells against hydrogen peroxide and epirubicin toxicity., *Br. J. Cancer.* 77 (1998) 1097–102. doi: 10.1038/bjc.1998.182
- [261] H. Fanaei, S. Khayat, I. Halvaei, V. Ramezani, Y. Azizi, A. Kasaeian, J. Mardaneh, M.R. Parvizi, M. Akrami, Effects of ascorbic acid on sperm motility, viability, acrosome reaction and DNA integrity in teratozoospermic samples., *Iran. J. Reprod. Med.* 12 (2014) 103–10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24799867>
- [262] F. Yazama, K. Furuta, M. Fujimoto, T. Sonoda, H. Shigetomi, T. Horiuchi, M. Yamada, N. Nagao, N. Maeda, Abnormal spermatogenesis in mice unable to synthesize ascorbic acid, *Anat. Sci. Int.* 81 (2006) 115–125. doi:10.1111/j.1447-073X.2006.00139.x.
- [263] A.E. Pegg, The function of spermine, *IUBMB Life.* 66 (2014) 8–18. doi:10.1002/iub.1237.
- [264] Caricasole, R.H. van Schaik, L.M. Zeinstra, C.D. Wierikx, R.J. van Gurp, M. van den Pol, L.H. Looijenga, J.W. Oosterhuis, M.F. Pera, Ward, D. de Bruijn, P. Kramer, F.H. de Jong, J. van den Eijnden-van Raaij, Human growth-differentiation factor 3 (hGDF3): developmental regulation in human teratocarcinoma cell lines and expression in primary testicular germ cell tumours., *Oncogene.* 16 (1998) 95–103. doi:10.1038/sj.onc.1201515.

- [265] K. Tykwinska, R. Lauster, P. Knaus, M. Rosowski, Growth and Differentiation Factor 3 Induces Expression of Genes Related to Differentiation in a Model of Cancer Stem Cells and Protects Them from Retinoic Acid-Induced Apoptosis, *PLoS One*. 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0070612.
- [266] M. Çalışkan, The metabolism of oxalic acid, *Turkish J. Zool.* 24 (2000) 103–106.
- [267] Y.T. Setsuko Sahara, Mamoru Aoto, Yutaka Eguchi, Naoko Imamoto, Yoshihiro Yoneda, Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation, *Nature*. 402 (1999) 168–173.
- [268] W.H. Schaefer, Reaction of primary and secondary amines to form carbamic acid glucuronides., *Curr. Drug Metab.* 7 (2006) 873–881. doi:10.2174/138920006779010629.
- [269] M. Watford, Glutamine metabolism and function in relation to proline synthesis and the safety of glutamine and proline supplementation., *J. Nutr.* 138 (2008) 2003S-2007S.
- [270] P. Newsholme, J. Procopio, M.M. Ramos Lima, T.C. Pithon-Curi, R. Curi, Glutamine and glutamate - Their central role in cell metabolism and function, *Cell Biochem. Funct.* 21 (2003) 1–9. doi:10.1002/cbf.1003.
- [271] F.A. Barile, Continuous Cell Lines as a Model for Drug Toxicity Assessment, in: *Vitr. Methods Pharm. Res.*, 1997: pp. 33–54. doi:10.1016/B978-012163390-5.50004-1.
- [272] D.C. Marks, L. Belov, M.W. Davey, R.A. Davey, A.D. Kidman, The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells, *Leuk. Res.* 16 (1992) 1165–1173. doi:10.1016/0145-2126(92)90114-M.
- [273] C.J. Mann, L. Yu, C.-M. Lo, M.K. Kim, High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography, *Opt. Express*. 13 (2005) 8693. doi:10.1364/OPEX.13.008693.
- [274] P. Bastiaens, Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell, *Trends Cell Biol.* 9 (1999) 48–52. doi:10.1016/S0962-8924(98)01410-X.
- [275] O. Ormachea, A. Villazón, Development of a low-cost epifluorescence microscope, *Investig. Desarro.* 17 (2017) 5–14. doi:10.23881/idupbo.017.1-1i.
- [276] J. Kapuscinski, DNA-Specific Fluorescent Probe, *Biotech. Histochem.* 70 (1995) 220–233. doi:10.3109/10520299509108199.
- [277] G. Crivat, J.W. Taraska, Imaging proteins inside cells with fluorescent tags, *Trends Biotechnol.* 30 (2012) 8–16. doi:10.1016/j.tibtech.2011.08.002.
- [278] L. Reimer and H. Kohl, Transmission Electron Microscopy, in: *Curr. Protoc. Microbiol.*, 2006: pp.

2B.1.1-2B.1.39.

- [279] M. Watanabe, X-Ray Energy-Dispersive Spectrometry in Scanning Transmission Electron Microscopes, in: Scanning Transm. Electron Microsc., Springer science, 2011: pp. 291–351. <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-7200-2>.
- [280] M.J. Jaroszeski, G. Radcliff, Fundamentals of flow cytometry, Appl. Biochem. Biotechnol. - Part B Mol. Biotechnol. 11 (1999) 37–53. doi:10.1007/BF02789175.
- [281] A. Radbruch, Flow Cytometry and Cell Sorting, 1992. doi:10.1016/j.anbehav.2008.03.004.
- [282] C.A. Laughton, M. Orozco, Nucleic acid simulations themed issue, Phys. Chem. Chem. Phys. 11 (2009) 10722–10728. doi:10.1039/b921472k.
- [283] G. Mariño, G. Kroemer, Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure, Cell Res. 23 (2013) 1247–1248. doi:10.1038/cr.2013.115.
- [284] B.D. Hames, Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach, 1998.
- [285] J.L. Brunelle, R. Green, Coomassie blue staining, 1st ed., Elsevier Inc., 2014. doi:10.1016/B978-0-12-420119-4.00013-6.
- [286] J.E. Noble, Quantification of protein concentration using UV absorbance and coomassie dyes, 1st ed., Elsevier Inc., 2014. doi:10.1016/B978-0-12-420070-8.00002-7.
- [287] M.C. Gómez Martín, M. Ballesteros González, Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores, in: Monogr. XXX Biomarcadores Analítica, Diagnóstico y Ter., Madrid, 2010: pp. 113–168. <http://analesranf.com/index.php/mono/article/view/1066>.
- [288] A.T. Kicman, M.C. Parkin, R.K. Iles, An introduction to mass spectrometry based proteomics- Detection and characterization of gonadotropins and related molecules, Mol. Cell. Endocrinol. 260–262 (2007) 212–227. doi:10.1016/j.mce.2006.02.022.
- [289] V.H. Wysocki, K.A. Resing, Q. Zhang, G. Cheng, Mass spectrometry of peptides and proteins, Methods. 35 (2005) 211–222. doi:10.1016/j.ymeth.2004.08.013.
- [290] R.B. Cole, Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, John Wiley and Sons, 2010. <http://books.google.com/books?id=5RLc0iPmhS8C&pgis=1>.
- [291] R.R. González, J.L.F. Moreno, P.P. Bolaños, A.G. Frenich, J.L.M. Vidal, Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: Hacia la seguridad alimentaria, Rev. Esp. Salud Publica. 81 (2007) 461–474. doi:10.1590/S1135-

57272007000500004.

- [292] E. López Villar, C. Nombela Cano, M. Røssel Larsen, Metodologías fosfoproteómicas útiles en estudios clínicos, *Inmunología*. 27 (2008) 36–44. doi:10.1016/S0213-9626(08)70047-7.
- [293] M. Locatelli, D. Melucci, G. Carlucci, C. Locatelli, Recent HPLC strategies to improve sensitivity and selectivity for the analysis of complex matrices, *Instrum. Sci. Technol.* 40 (2012) 122–137. doi:10.1080/10739149.2011.651668.
- [294] K. Neetu, G. Ankit, T. Ruchi, B. Ajay, B. Prashant, A review on mass spectrometry detectors, *Int. Res. J. Pharm.* 3 (2012) 33–42.
- [295] F.A. Mellon, Principles and Instrumentation, in: *Mass Spectrom.*, Elsevier Science Ltd, 2003: pp. 3739–3749. doi:10.1016/B0-12-227055-X/00746-X.
- [296] R. Liu, Q. Li, L.M. Smith, Detection of large ions in time-of-flight mass spectrometry: Effects of ion mass and acceleration voltage on microchannel plate detector response, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 25 (2014) 1374–1383. doi:10.1007/s13361-014-0903-2.
- [297] T. Gys, Micro-channel plates and vacuum detectors, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* 787 (2015) 254–260. doi:10.1016/j.nima.2014.12.044.
- [298] S.W. Qi, Q.X. Li, Proteomics in Pesticide Toxicology, in: *Hayes' Handb. Pestic. Toxicol.*, 2010: pp. 603–626. doi:10.1016/B978-0-12-374367-1.00021-5.
- [299] K. Kito, T. Ito, Mass Spectrometry-Based Approaches Toward Absolute Quantitative Proteomics, *Curr. Genomics*. 9 (2008) 263–274. doi:10.2174/138920208784533647.
- [300] L. Arike, L. Peil, Spectral Counting Label-Free Proteomics, in: *Shotgun Proteomics Methods Protoc. Methods Mol. Biol.*, 2014: pp. 213–222. doi:10.1007/978-1-4939-0685-7.
- [301] S. Kuntumalla, J.C. Braisted, S.T. Huang, P.P. Parmar, D.J. Clark, H. Alami, Q. Zhang, A. Donohue-Rolfe, S. Tzipori, R.D. Fleischmann, S.N. Peterson, R. Pieper, Comparison of two label-free global quantitation methods, APEX and 2D gel electrophoresis, applied to the *Shigella dysenteriae* proteome, *Proteome Sci.* 7 (2009) 1–16. doi:10.1186/1477-5956-7-22.
- [302] M. Mann, Functional and quantitative proteomics using SILAC., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 952–8. doi:10.1038/nrm2067.
- [303] S.-E. Ong, M. Mann, A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC), *Nat. Protoc.* 1 (2007) 2650–2660. doi:10.1038/nprot.2006.427.

- [304] J. Krijgsveld, R.F. Ketting, T. Mahmoudi, J. Johansen, M. Artal-sanz, C.P. Verrijzer, R.H. a Plasterk, A.J.R. Heck, Metabolic labeling of *C. elegans* and *D. melanogaster* for Quantitative Proteomics, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 927–931. doi:10.1038/nbt848.
- [305] M. Krüger, M. Moser, S. Ussar, I. Thievensen, C. a. Luber, F. Forner, S. Schmidt, S. Zanivan, R. Fässler, M. Mann, SILAC Mouse for Quantitative Proteomics Uncovers Kindlin-3 as an Essential Factor for Red Blood Cell Function, *Cell.* 134 (2008) 353–364. doi:10.1016/j.cell.2008.05.033.
- [306] N. Rauniyar, D.B. McClatchy, J.R. Yates, Stable isotope labeling of mammals (SILAM) for in vivo quantitative proteomic analysis, *Methods.* 61 (2013) 260–268. doi:10.1016/j.ymeth.2013.03.008.
- [307] T. Geiger, J. Cox, P. Ostasiewicz, J.R. Wisniewski, M. Mann, Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue., *Nat. Methods.* 7 (2010) 383–5. doi:10.1038/nmeth.1446.
- [308] S.J. Deeb, R.C.J. D'Souza, J. Cox, M. Schmidt-Supprian, M. Mann, Super-SILAC Allows Classification of Diffuse Large B-cell Lymphoma Subtypes by Their Protein Expression Profiles, *Mol. Cell. Proteomics.* 11 (2012) 77–89. doi:10.1074/mcp.M111.015362.
- [309] G.J. Patti, O. Yanes, G. Siuzdak, Metabolomics: the apogee or the omic triloggy, *Nature Rev. Molecular Cell Biol.* 13 (2013) 263–269. doi:10.1038/nrm3314.Metabolomics.
- [310] Z. Lei, D. V. Huhman, L.W. Sumner, Mass spectrometry strategies in metabolomics, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 25435–25442. doi:10.1074/jbc.R111.238691.
- [311] S.C. Sapcariu, T. Kanashova, D. Weindl, J. Ghelfi, G. Dittmar, K. Hiller, Simultaneous extraction of proteins and metabolites from cells in culture, *MethodsX.* 1 (2014) 74–80. doi:10.1016/j.mex.2014.07.002.
- [312] Y. Wang, L. Xu, H. Shen, J. Wang, W. Liu, X. Zhu, R. Wang, X. Sun, L. Liu, Metabolomic analysis with GC-MS to reveal potential metabolites and biological pathways involved in Pb & cd stress response of radish roots, *Sci. Rep.* 5 (2015) 1–13. doi:10.1038/srep18296.
- [313] G. Moros, A.C. Chatziioannou, H.G. Gika, N. Raikos, G. Theodoridis, Investigation of the derivatization conditions for GC-MS metabolomics of biological samples, *Bioanalysis.* 9 (2017) 53–65. doi:10.4155/bio-2016-0224.

ANEXO I. TÉCNICAS BIOANALÍTICAS

I. 1 Ensayo de viabilidad celular

Mientras que los experimentos de toxicidad realizados con animales arrojan información relativa a la dosis que origina una toxicidad letal o subletal, los experimentos realizados con células miden la concentración y el tiempo de exposición a los cuales una sustancia tóxica daña componentes celulares, estructuras o rutas metabólicas. Estos estudios *in vitro* permiten predecir los efectos tóxicos *in vivo* y los posibles riesgos asociados con ellos. Hoy en día se utilizan numerosos métodos para testar la toxicidad de un compuesto, entre los que se encuentran la observación de cambios morfológicos, o el cálculo de la concentración a la cual el 50% de las células no se multiplican (ID_{50}) tras ser expuestas al tóxico en cuestión. Uno de los parámetros de citotoxicidad más evaluado es la viabilidad celular, la cual puede ser estimada mediante diversos ensayos que se basan principalmente en la integridad de la membrana celular o la actividad metabólica de células viables. Los métodos más comunes de evaluación de la viabilidad celular son el conteo del número de células no viables, observables tras la tinción con azul de tripano que sólo atravesará la membrana celular en el caso de estar dañada, o el ensayo MTT [271].

El ensayo MTT, utilizado en esta Tesis Doctoral, se basa en la medida de la integridad y actividad mitocondrial mediante el uso de una sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), conocida como reactivo MTT, que es activamente absorbida por las células. Una vez que penetra en ellas, la actividad de las reductasas mitocondriales de las células vivas lo reduce a un compuesto insoluble y violeta denominado formazán (**Figura 42**). Solubilizando este compuesto en DMSO y midiendo el nivel de absorbancia de la disolución resultante a 595 nm, se puede estimar el porcentaje de viabilidad de las diferentes líneas celulares expuestas a un compuesto potencialmente tóxico [271,272].

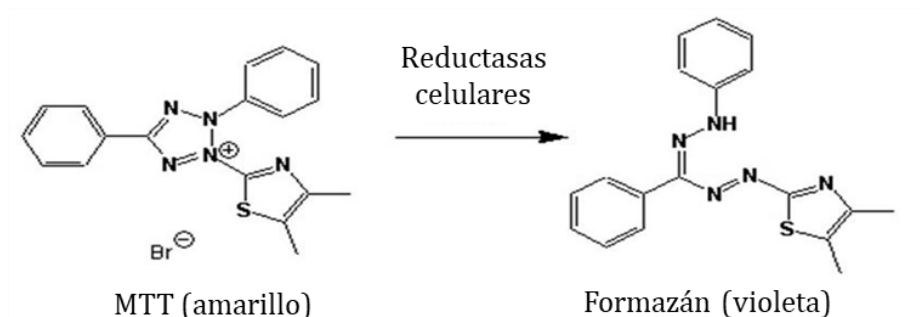


Figura 42. Reducción de MTT a formazán.

I. 2 Microscopía de contraste de fases y de epifluorescencia

Muchas de las muestras biológicas observadas al microscopio, como las células vivas y sus componentes intracelulares, son en su mayoría transparentes, por lo que es difícil observarlas mediante microscopía de campo brillante convencional. Para solventar este problema se han desarrollado varias técnicas que hacen visibles los objetos de la fase transparente, y que han desempeñado un papel muy importante en el desarrollo de la biología y la medicina modernas. Tal es el caso del contraste de fases de Zernike. La microscopía de contraste de fases está basada en el hecho de que la velocidad de la luz es inversamente proporcional a los índices de refracción de los medios a través de los cuales se propaga. De este modo, se obtiene un gran aumento del contraste de las células y de las estructuras intracelulares, ya que difieren ligeramente en su índice de refracción respecto al de su entorno [273].

Otra técnica que nos permite visualizar la célula de una forma detallada, así como sus componentes o lo que sucede en ella, es la microscopía de epifluorescencia. Este microscopio se emplea para la detección de estructuras celulares o moléculas que se pueden marcar diferencialmente, y también para evaluar la localización de compuestos intracelulares capaces de emitir fluorescencia, como es el caso de los QDs internalizados tras su exposición. La emisión de luz del proceso de fluorescencia es casi simultánea con la absorción de la luz de excitación debido a una variación de tiempo que generalmente dura menos de un microsegundo. En un microscopio de epifluorescencia, la luz de una longitud de onda específica se produce al pasar luz

multiespectral, generada por una lámpara halógena de alta potencia, a través de un filtro de excitación selectivo de longitud de onda. Las longitudes de onda que pasan por el filtro de excitación, a menudo en las regiones ultravioleta, azul o verde del espectro visible, se reflejan desde la superficie de un espejo divisor de haz para irradiar la muestra con luz intensa. La excitación del fluorocromo produce la emisión de fotones de una longitud de onda mayor que la luz incidente (**Figura 43**). La luz de emisión recogida por el objetivo vuelve a pasar a través del espejo dicromático, donde es de nuevo seleccionada mediante un filtro de barrera (o de emisión), que bloquea las longitudes de onda de excitación no deseadas. Es importante señalar que el único caso en microscopía óptica donde, tras la excitación, la muestra produce luz propia, es con el empleo de moléculas o sustancias fluorescentes. La fluorescencia es ideal para observar la ubicación de las moléculas en las células ya que es una técnica no invasiva que proporciona una alta sensibilidad y especificidad de señal [274,275]. Cuando lo que se desea observar no presenta autofluorescencia pueden emplearse colorantes fluorescentes denominados fluorocromos que tengan afinidad por una parte concreta de la célula o el tejido que se quiere estudiar. Un ejemplo de ellos es el DAPI, que se une específicamente a las moléculas de ADN formando un complejo que emite en color azul tras ser excitado con luz UV a 365 nm [276]. Otro fluorocromo, que al igual que el anterior puede ser empleado en células, es la faloidina, la cual presenta afinidad por los filamentos de actina, permitiendo por tanto visualizar la estructura del citoesqueleto. Además, se pueden emplear anticuerpos fluorescentes que tengan afinidad por un antígeno concreto, lo que se conoce como inmunofluorescencia [277].

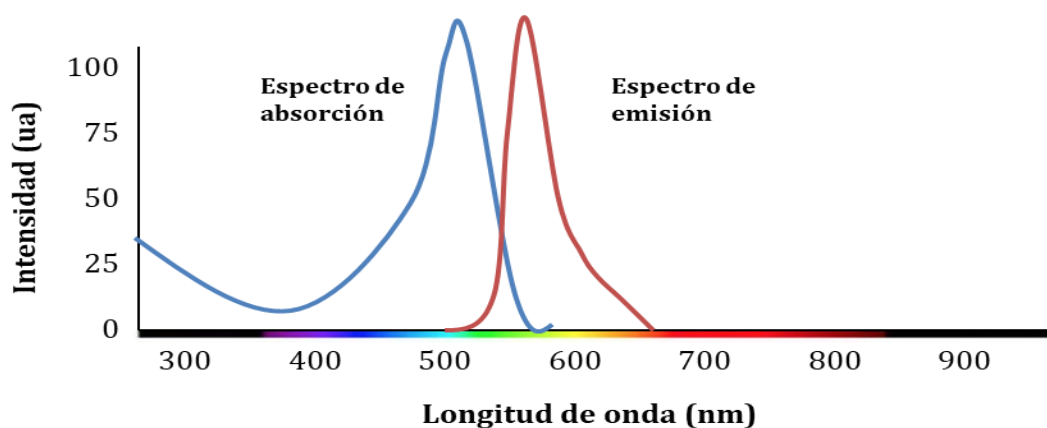


Figura 43. Espectro de absorción y de emisión de un fluorocromo.

I. 3 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) ha sido durante mucho tiempo una herramienta importante en el desarrollo del campo de la microbiología. La principal virtud de estos microscopios es su alta resolución, proporcionada por haces de electrones acelerados a alta tensión con longitudes de onda efectivas. En el microscopio electrónico de transmisión se irradia una muestra con un haz de electrones de 200 keV. Parte de esos electrones son transmitidos, otra parte son dispersados y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios o Auger, rayos X, etc. Este microscopio emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes, la difracción de los electrones para obtener información acerca de la estructura cristalina y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra.

En teoría, los microscopios electrónicos son capaces de llegar a la resolución molecular si sólo se considera la limitación de la longitud de onda (difracción), es por ello que esta técnica es frecuentemente utilizada para estudios de localización intracelular de nanopartículas. Sin embargo, existen ciertas limitaciones del microscopio electrónico como son el hecho de que las muestras deben estar embebidas en una resina seca, que permita la realización de cortes ultrafinos con el ultramicrotomo y que sean capaces de dispersar electrones en condiciones de vacío. Además, la preparación de la muestra requiere de la fijación o estabilización, y de la introducción de tinción con metales pesados que dispersen electrones para generar el contraste que permita obtener imágenes. El glutaraldehído y el formaldehído son excelentes fijadores que permiten preservar la estructura celular debido a que reaccionan con aminas y aminoácidos (lisina y arginina) generando proteínas reticuladas. Por su parte, el tetraóxido de osmio es capaz de reaccionar con algunas proteínas a la vez que con lípidos insaturados estabilizando las membranas celulares y, además, añade densidad electrónica que permite mejorar el contraste [65,278].

La posibilidad de obtener las imágenes por TEM junto con el espectro de energía dispersiva de rayos X, ha permitido reconocer todos los elementos principales de la tabla periódica en cualquier punto medido. El análisis de rayos X posee una resolución

espacial relativamente alta lo que permite la caracterización de los materiales con un enfoque robusto. Esta técnica es frecuentemente aplicada a muestras biológicas con la finalidad de localizar e identificar compuestos inorgánicos o nanopartículas en el interior celular [279].

I. 4 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite la medida individual de características físicas o químicas de partículas que se hacen pasar de una en una a través de una fuente de luz láser. Es utilizada para medir tanto células completas como componentes celulares.

Un citómetro de flujo consta de una primera parte en la que se incluye un sistema hidrodinámico que dirige las células hacia el lugar donde se produce la interacción con el haz de luz láser, y que se denomina punto de detección o de interrogación. El enfoque hidrodinámico permite la llegada de las células de una en una a este punto, además de retirar los líquidos de desecho una vez realizada la detección. Por otro lado, posee un sistema de dirección, colección y traslación de la luz dispersada y de la fluorescencia emitida, resultante de la interacción del láser con las células. La última parte del equipo es la que controla y almacena los datos [280]. Cuando una célula pasa por el punto de detección y el haz luminoso procedente del láser impacta con ella, la célula dispersa la luz en todas direcciones. La parte de luz que se dispersa en la dirección del haz de luz incidente se denomina forward scatter o dispersión delantera. La magnitud de esa dispersión constituye la primera medida importante en citometría, ya que es proporcional al tamaño de la célula. La complejidad celular viene determinada, entre otras cosas, por la presencia en la célula de estructuras específicas o de un gran número de orgánulos. En función de ésta, se originará una dispersión de la luz lateral, side scatter, recogida por otro detector específico, normalmente situado en un ángulo de 90° respecto a la dirección de la luz del láser incidente. Un software es capaz de generar un histograma bidimensional llamado de dispersión, que relaciona tamaño (forward scatter) con complejidad (side scatter), haciendo posible discriminar subpoblaciones dentro de la muestra que compartan un tamaño y complejidad concretos [281].

Además de la luz dispersada, los citómetros son capaces de detectar y analizar la luz fluorescente emitida por las propias células. Éstas pueden marcarse específicamente con anticuerpos conjugados con moléculas fluorescentes, permitiendo que sólo las células que exhiban cierto marcador sean detectadas. Esta fluorescencia emitida es recogida en la misma dirección que el side scatter, aunque en este caso, los fotones atraviesan una serie de filtros, adaptados a la longitud de onda de fluorescencia que se quiere detectar, antes de llegar al detector correspondiente.

I. 4. a Ciclo celular

Para hacer un estudio del arresto del ciclo celular se puede utilizar esta técnica de citometría de flujo junto con el reactivo de Hoechst 33342. Éste es un fluorocromo permeable a la membrana plasmática que tiene especificidad por los pares de bases adenina-timina, por lo que penetra en todas las células, uniéndose y tiñendo el ADN. La longitud de onda de excitación de este fluorocromo es de 332 nm, y la emisión de 461 nm, aproximadamente [282]. La cantidad de reactivo que se intercala es proporcional a la cantidad de ADN presente en cada célula. Puesto que en cada fase del ciclo celular la cantidad de ADN varía, como se puede ver en la **Figura 44**, mediante citometría de flujo se puede determinar el porcentaje de la población celular estudiada que se encuentra en cada una de las fases del ciclo y, por tanto, evaluar posibles alteraciones como consecuencia de la exposición al compuesto potencialmente tóxico.

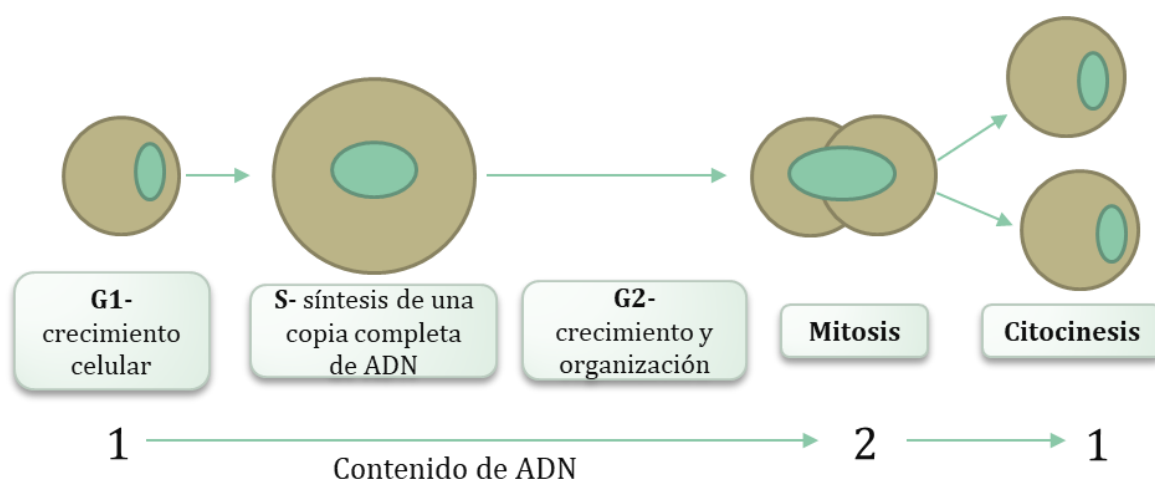


Figura 44. Fases que componen el ciclo de división celular: Interfase (G1, S, G2) y mitosis (M).

I. 4. b Ensayo de apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular que ocurre como parte del desarrollo normal de una célula. La necrosis, sin embargo, es una muerte celular accidentada y que incluye cambios morfológicos y celulares como la compactación y fragmentación de la cromatina, encogimiento del citoplasma y pérdida de asimetría en la membrana. En células sanas la fosfatidilserina (PS) se encuentra localizada en el interior de la superficie citoplasmática de la membrana celular, mientras que en células apoptóticas, la PS transloca del interior al exterior de la misma para poder ser reconocida por macrófagos (*Figura 45*) [283].

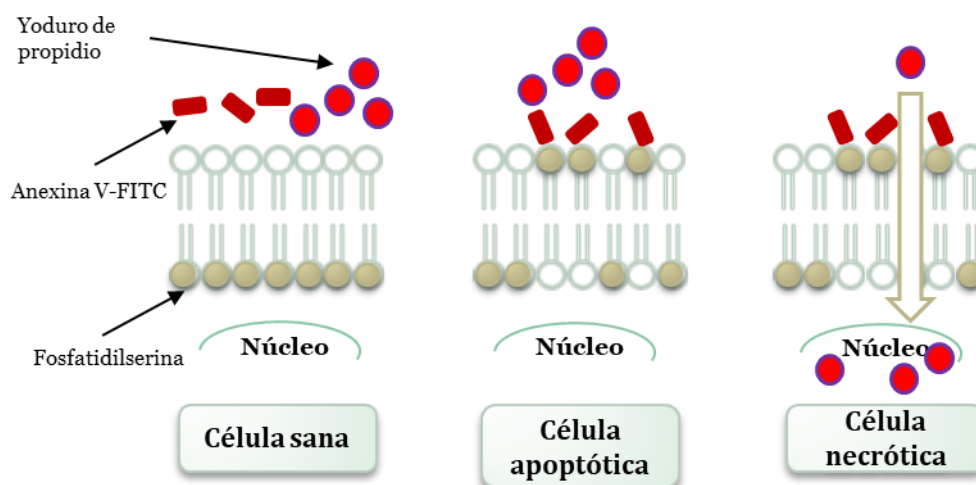


Figura 45. Representación del uso de anexina V-FITC y yoduro de propidio para identificar células sanas, apoptóticas o necróticas en función de la estructura de la membrana.

La citometría de flujo, combinada con el uso de las moléculas fluorescentes adecuadas, es una de las formas más comúnmente utilizadas para medir el número de células inducidas a apoptosis y necrosis. Para ello se realiza un marcaje diferencial de las células mediante el uso de anexina V, una proteína que tiene afinidad por PS, conjugada con el fluoróforo FITC cuyas longitudes de onda de excitación y emisión son 494 nm y 518 nm, respectivamente. Las células que emiten a esta longitud de onda se consideran apoptóticas por translocar la PS. Adicionalmente se utiliza el yoduro de propidio, un

tinte de ácidos nucleicos incapaz de penetrar la membrana de células vivas y apoptóticas, cuyas longitudes de onda de excitación y emisión son 515 nm y 617 nm, respectivamente. Las células que emiten a esta longitud de onda se consideran necróticas ya que, si el tinte ha penetrado la célula y la ha marcado, es porque su membrana se encuentra comprometida (*Figura 45*).

I. 5 SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida es una de las alternativas más utilizadas para la purificación y separación de proteínas. Esta técnica permite separar macromoléculas cargadas y evaluar diferencias en su movilidad cuando se les somete a la acción de un campo eléctrico. La modalidad más utilizada es la llamada SDS-PAGE. El SDS es un detergente aniónico que actúa rompiendo las interacciones hidrofóbicas de las proteínas desnaturizándolas, es decir, rompiendo su estructura terciaria y cuaternaria. Las proteínas desnaturizadas adoptan una estructura en forma de bastoncillo con una serie de moléculas de SDS cargadas negativamente rodeando la cadena polipeptídica. Al formarse el complejo SDS-proteína, se observa un valor constante de la relación carga/masa consiguiéndose, por tanto, una separación de las proteínas en base a su tamaño, ya que la velocidad de migración desde el cátodo al ánodo es función directa de su peso molecular. En este sistema de separación, las muestras se cargan sobre un gel de apilamiento (stacking gel), que tiene un tamaño de poro grande y diferente cantidad del tampón iónico y pH al gel de separación de las proteínas. La finalidad de incorporar esta segunda fase en el gel de acrilamida es mantener la buena resolución del gel a pesar de cargar volúmenes relativamente grandes de muestras proteicas, ya que se concentran en bandas estrechas antes de entrar en el gel de separación (running gel). El tamaño de poro del gel viene determinado por la proporción de acrilamida-bisacrilamida utilizada, por lo tanto, el porcentaje de acrilamida es crucial para la separación óptima de las proteínas. Para la mayor parte de las aplicaciones se emplea entre un 5 y un 20% de entrecruzamiento, disminuyendo el rango de masas que se separan en el gel con buena resolución a medida que aumenta el porcentaje de acrilamida [284].

Puesto que las proteínas son incoloras, existen diferentes técnicas de tinción que permiten la visualización de las proteínas separadas en el gel de acrilamida. Uno de los posibles tintes a utilizar es la plata que, a pesar de proporcionar la mejor sensibilidad, es un método costoso y más complejo que otros debido al mayor número de etapas. La tinción con azul de Coomassie es el más utilizado por su sencillez y rapidez, presentando una sensibilidad que oscila entre 0,1-0,5 µg de proteína [285]. Este tinte es el mismo que se encuentra en el reactivo Bradford empleado para la cuantificación de proteínas, el cual, cuando se encuentra a pH ácido, se une a los residuos de histidina, arginina, fenilalanina, triptófano y tirosina, dando lugar a un compuesto coloreado que absorbe a 595 nm (azul) [286].

I. 6 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica que se emplea para determinar la masa molecular de un compuesto mediante el uso de instrumentos que pueden medir la relación masa/carga (m/z) de iones. La forma más sencilla de mover un analito es cargarlo eléctricamente (formar los iones) y aplicarle un gradiente de campo eléctrico en sentido negativo a su carga usando un alto vacío en el sistema.

La espectrometría de masas es la técnica analítica esencial en proteómica y metabolómica por su alta sensibilidad y selectividad, y por su flexibilidad, que permite diseñar procedimientos analíticos en relativamente poco tiempo. Su amplio intervalo de aplicabilidad permite trabajar con moléculas grandes o pequeñas, y también ofrece la posibilidad de obtener numerosa cantidad de información en un único experimento. Asimismo, es una técnica automatizable y de fácil acoplamiento a técnicas cromatográficas. Esta instrumentación analítica se utiliza ampliamente con fines cualitativos tales como la obtención de información estructural a partir de los fragmentos generados, o la determinación de masas moleculares; pero también se pueden realizar análisis cuantitativos absolutos utilizando patrones internos o externos, o análisis cuantitativos relativos, llegando a alcanzar límites de detección del orden de picomoles y femtomoles [287].

Los espectrómetros de masas se componen de cuatro elementos básicos: sistema de introducción de muestra (directo o con separación cromatográfica), fuente de ionización, analizador de masas y detector (*Figura 46*).

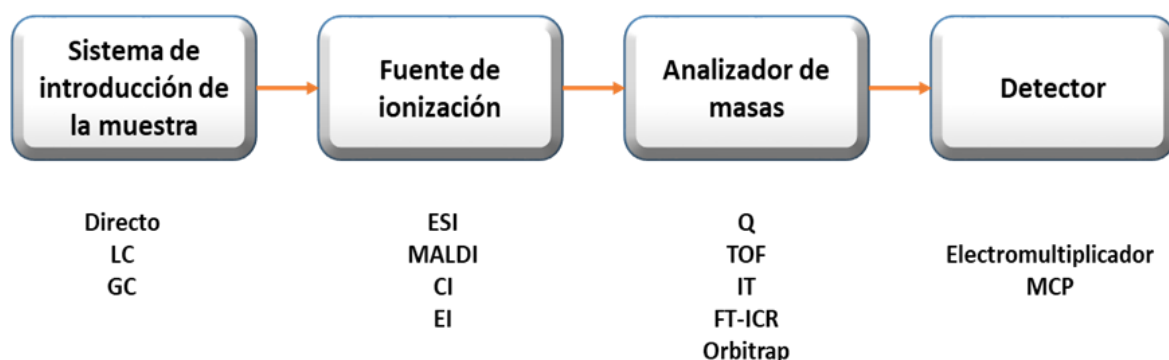


Figura 46. Esquema de los elementos básicos que conforman un espectrómetro de masas.

La fuente de ionización convierte las moléculas en iones en fase gaseosa para que puedan pasar al analizador de masas, donde son separados según su relación masa/carga, llegando por tanto al detector de forma secuencial. Las señales captadas por el detector son integradas por un sistema informático que genera un gráfico denominado espectro de masas, donde se representa la abundancia (intensidad) de los iones en el eje de ordenadas y la relación m/z en el eje de abscisas. Esta relación del valor m/z es lo que permite la identificación de los diferentes compuestos. La señal correspondiente a un ion aparece en forma de varios picos que corresponden a la distribución estadística de los distintos isótopos del ion.

I. 6. a Fuentes de ionización

Los sistemas de ionización o fuentes de iones pueden ser: de ionización en fase gaseosa o de ionización por desorción. En el primer caso, la muestra se volatiliza y posteriormente se ioniza, estas fuentes se utilizan para compuestos térmicamente estables y de pesos moleculares menores de aproximadamente 10^3 Da, suelen

acoplarse a la separación por GC. Las fuentes de ionización en fase gaseosa más utilizadas, sobre todo en estudios de metabolómica, son impacto electrónico e ionización química, también se conocen como fuentes de ionización duras porque para llevar a cabo la ionización fragmentan la molécula inicial. En el segundo caso, ionización por desorción, se trata de técnicas de ionización suave, la muestra se transforma directamente en iones gaseosos. Estos sistemas son aplicables a muestras no volátiles y térmicamente inestables, y también son válidas para moléculas que tienen pesos moleculares mayores de 10^5 Da. Entre estas últimas destacan las fuentes de ionización mediante desorción por láser asistida por matriz (MALDI) y ESI, que pueden ser acopladas con cromatografía líquida. Estas dos fuentes son las más utilizadas en el campo de la proteómica y la metabolómica. [287]. A continuación, se describe brevemente el fundamento de estas fuentes de ionización:

- Ionización por impacto electrónico. Es un proceso en el que la muestra, previamente vaporizada, se somete a un bombardeo mediante electrones acelerados que chocan con las moléculas provocando su ionización. La elevada energía cinética de los electrones acelerados y su pequeña masa proporcionan a las moléculas con las que impactan una energía que provoca una elevada fragmentación, dando lugar a un gran número de iones positivos que incluso puede suponer la desaparición del ion molecular [287].
- Ionización química. Las moléculas de la muestra en fase gaseosa se ionizan al colisionar con los iones producidos al bombardear un gas reactivo con electrones. El gas elegido es clave para provocar la ionización del analito, pero también hay que considerar la diferente afinidad hacia los protones, tanto del gas elegido como del analito. La ionización química permite obtener información sólo sobre la masa molecular de compuestos pequeños, siendo otra limitación la falta de información estructural de los espectros de masas obtenidos por esta técnica de ionización [287].
- Ionización mediante desorción por láser asistida por matriz (MALDI). El desarrollo de este sistema de desorción se realizó por dos grupos de investigación, siendo merecedor del Premio Nobel de Química en 2002 Koichi Tanaka. La técnica

consiste en co-cristalizar la muestra con una matriz (ácido orgánico), que se encuentra en una proporción mucho mayor que la muestra (10.000:1), sobre una superficie de metal; de esta forma se diluyen y aíslan los analitos evitando la formación de agregados difíciles de desorber [288]. Al irradiar la matriz con un haz láser de elevada potencia (10^6 W/cm²) y de pulsos cortos, durante algunos nanosegundos, ésta absorbe energía y favorece la transferencia de H⁺ desde la matriz a las moléculas de la muestra, dando lugar a especies cargadas. Se consigue así la desorción e ionización de las moléculas de la matriz y la muestra, manteniéndolas en fase gaseosa (*Figura 47.A*) [289]. Esta técnica de ionización permite ionizar macromoléculas biológicas no volátiles tales como las glicoproteínas [288].

- Ionización por electrospray (ESI). El desarrollo de este sistema de ionización dio lugar a que John Fenn obtuviera el Premio Nobel de Química en 2002. En este sistema, la muestra introducida en disolución se hace pasar por un capilar o aguja de acero inoxidable a presión atmosférica sobre la que se aplica un alto voltaje (3-4 kV), de manera que se generan pequeñas gotas cargadas [287]. Dichas gotas son repelidas por la aguja hacia el cono de muestreo en el contraelectrodo. Cuando las gotas cargadas atraviesan el espacio entre la punta de la aguja y el separador, se va produciendo la evaporación del solvente causando la disminución de tamaño de las mismas. Este proceso de desolvatación es ayudado por un flujo de nitrógeno cálido conocido como el gas de secado. A medida que se produce la evaporación del disolvente, la gota se contrae hasta que llegue al punto en que la tensión superficial ya no pueda mantener la carga, conocido como el límite de Rayleigh. En este punto se produce una explosión Coulómbica y la gota se rompe produciendo gotitas más pequeñas. Algunos de los iones pasan a través del separador a una región de vacío intermedio y desde allí a través de una pequeña abertura llegan al analizador que se mantiene a alto vacío (*Figura 47.B*). Las moléculas así ionizadas pueden contener una o múltiples cargas; por tanto, los espectros de masas resultantes pueden tener muchos iones diferentes para un mismo compuesto, ya que lo que realmente detectan los espectrómetros de masas es la relación m/z [288]. Una modificación reciente de esta técnica, llamada ionización por pulverización electrosónica (ESSI),

produce iones con uno o solo unos pocos estados de carga, haciendo más sencilla la interpretación de los espectros [289].

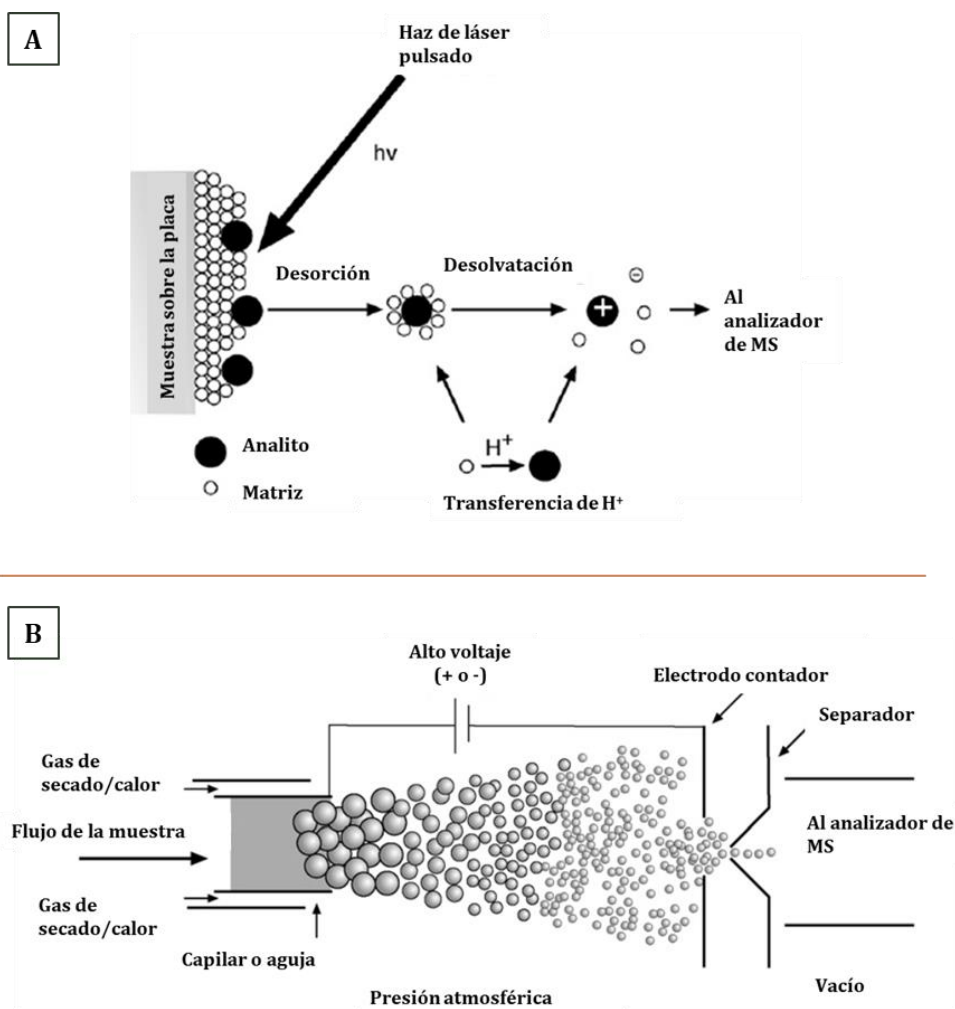


Figura 47. Fuentes de ionización suave A: MALDI y B: ESI [289].

Otra variante de esta fuente de ionización, conocida como nanoelectrospray (nanoESI), se desarrolló para ionizar proteínas o péptidos. El pequeño tamaño de estas fuentes de iones hace que los analitos se vean menos afectados por las impurezas. Definitivamente, la mayor ventaja que proporciona este sistema nanoESI es el incremento de la sensibilidad, en varios órdenes de magnitud con respecto al

sistema ESI convencional, debido a que la velocidad de desorción de los iones en las pequeñas gotas es mucho mayor que en las gotas grandes [290].

I. 6. b Analizadores de masas

La misión del analizador de masas es la de separar los iones en función de su relación m/z y enfocarlos, una vez separados, hacia el detector. Los distintos analizadores aprovechan las propiedades del movimiento de las partículas (energía cinética, velocidad y momento de fuerza) para llevar a cabo esta separación. La elección del analizador se realiza en función de su resolución, del intervalo de masas y de la exactitud de las masas que es capaz de separar, del intervalo dinámico lineal, de la velocidad de barrido, de la sensibilidad, de la eficacia y de su adaptabilidad (posibilidad de poder utilizar distintos modos de ionización) [287].

A continuación, se describen las principales características de los analizadores más comunes:

- Analizador de tiempo de vuelo (TOF). Como se observa en la **Figura 48.A**, un pequeño gradiente de voltaje (20-30 kV) provoca la aceleración de los iones que atraviesan libremente un tubo largo, como si “volaran”. El tiempo (t) que tardan en llegar los iones al detector (tiempo de vuelo) depende de su relación m/z según la **Ecuación 6**, donde d es la distancia del tubo de vuelo y V el potencial de aceleración, ambos constantes para un mismo analizador. Los iones no están sometidos ni a un campo eléctrico ni a uno magnético. Como todos los iones tienen la misma energía cinética, los iones cargados con una masa más grande viajarán con una velocidad más baja a lo largo del tubo y llegarán más tarde al detector en comparación con aquellos con masa más pequeña, es decir, los iones se separan de acuerdo a sus velocidades [288]. La resolución de estos equipos ha ido aumentando a más de 10.000 gracias a la manipulación de los iones mediante el retraso de la salida de iones de la fuente, las fuentes que permiten gradientes de voltaje complejos y la tecnología del reflectrón. Usando el reflectrón, se puede disminuir sustancialmente las variaciones de los tiempos de vuelo, de los iones con

la misma relación masa-carga (m/z), causada por una diferencia de energía cinética de estos iones a la salida de la fuente. Esta resolución se traduce en una mejor separación de los picos espectrales y, por tanto, permite la obtención de la masa exacta de los compuestos determinados [289]. Además, es el analizador ideal para la fuente de ionización MALDI. En conjunto realizan análisis muy rápidos, pueden procesar 100 muestras en 10 minutos. Permite la determinación de masas en un amplio intervalo (100-250.000 u.a.) y se obtienen espectros de masas sencillos, debido a que la mayoría de los iones tienen una única carga. Además, tiene una sensibilidad elevada que puede llegar a detectar cantidades del orden de átomos en péptidos de pequeño tamaño. Por otro lado, tienen baja reproducibilidad derivado del difícil control del proceso de cristalización y producción de iones [287].

$$t^2 = \frac{m}{z} + \frac{d^2}{2V}$$

Ecuación 6

- Analizador de tipo cuadrupolo (Q). Consiste en 4 barras paralelas, separadas entre ellas, a las que se les aplica un potencial de corriente continua, y lentes con un campo eléctrico oscilante (**Figura 48.B**). El campo creado en las barras actúa como filtro, de forma que, para un voltaje dado, sólo los iones que presentan una trayectoria estable (iones resonantes) las atraviesan y llegan al detector para dispersarse en función de la relación m/z [291]. Este analizador permite realizar un barrido espectral de los valores de m/z modificando las señales eléctricas con el tiempo. El Q es muy utilizado por su sencillez, por ser muy adecuado para cualquier tipo de interfases como el ESI, y por su bajo coste. No obstante, presenta limitaciones en cuanto al intervalo de trabajo (0-4000 m/z), salvo que la molécula pueda cargarse múltiples veces, la baja resolución sobre todo cuando se quiere mejorar la sensibilidad, y la dificultad para la determinación exacta de masas [287,289].
- Trampa iónica (IT). Está formada por el electrodo de entrada, el anular y el de salida constituyendo el anillo central. En este anillo se consiguen “atrapar” y mantener los iones, procedentes de la fuente de iones, al aplicar simultáneamente

corriente continua y radiofrecuencia. Si se aumenta el potencial, las órbitas de los iones pesados llegan a estabilizarse, mientras que los iones más ligeros se desestabilizan, siendo estos últimos los primeros en salir y en llegar al detector. Las trampas de iones cuadrupolares, como la que se muestra en la **Figura 48.C**, además de ser las más económicas, han demostrado ser muy útiles en el análisis de muestras de alta complejidad. Esto se debe a que pueden cambiar rápidamente el escaneo para analitos de diferentes masas (escaneo MS) y generar espectros de fragmentación (exploración MS/MS) de los iones detectados en ese escaneo. Además, poseen una elevada sensibilidad porque pueden concentrar gran cantidad de iones en el campo de captura y adquirir los datos de manera muy rápida. Sin embargo, tienen una resolución limitada y una relativamente baja capacidad de atrapar iones. Este es el motivo por cual se desarrolló el analizador de trampa de iones lineal, el confinamiento en el campo de radiofrecuencia existe solo en dos dimensiones (x e y, radial). Consiste en cuatro barras paralelas cortadas en tres secciones con una ranura longitudinal. El funcionamiento interno es esencialmente el mismo que en la trampa tradicional, con la particular diferencia, de que los iones son extraídos radialmente a través de las ranuras practicadas en las barras de los electrodos. Este analizador es capaz de atrapar mejor los iones que el cuadrupolar lo que supone la mejora del rango dinámico, la resolución y la sensibilidad de la técnica [287,289].

- Analizador de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR). Es un analizador que dispone de una celda de trampa de iones como elemento principal, estas celdas están diseñadas aprovechando el fenómeno de resonancia iónica de ciclotrón. Este analizador utiliza campos magnéticos altos para atrapar los iones y la resonancia de ciclotrón para detectarlos y excitarlos. Los iones son atrapados en el interior de un campo magnético intenso. Si la velocidad de un ion es lenta y el campo magnético aplicado es intenso, el radio de la trayectoria del ion se hace pequeño. Entonces, el ion puede ser atrapado en una trayectoria circular que crea el campo magnético. El campo magnético es orientado a lo largo del eje z y los iones son introducidos y atrapados a lo largo de este eje, mientras que, en los planos x e y, los iones rotan alrededor del eje z. Cada ion

atrapado lleva asociada una frecuencia de oscilación que depende de su m/z . La medida de las frecuencias de las corrientes eléctricas inducidas permite obtener el valor de las masas de los iones y la señal es medida en el tiempo, siendo su intensidad proporcional al tiempo de medida (**Figura 48.D**) [292]. Estos analizadores poseen una elevada resolución (superior a 1.000.000) permitiendo la detección de numerosos analitos en muestras muy complejas mediante la inyección directa de la muestra [287,289].

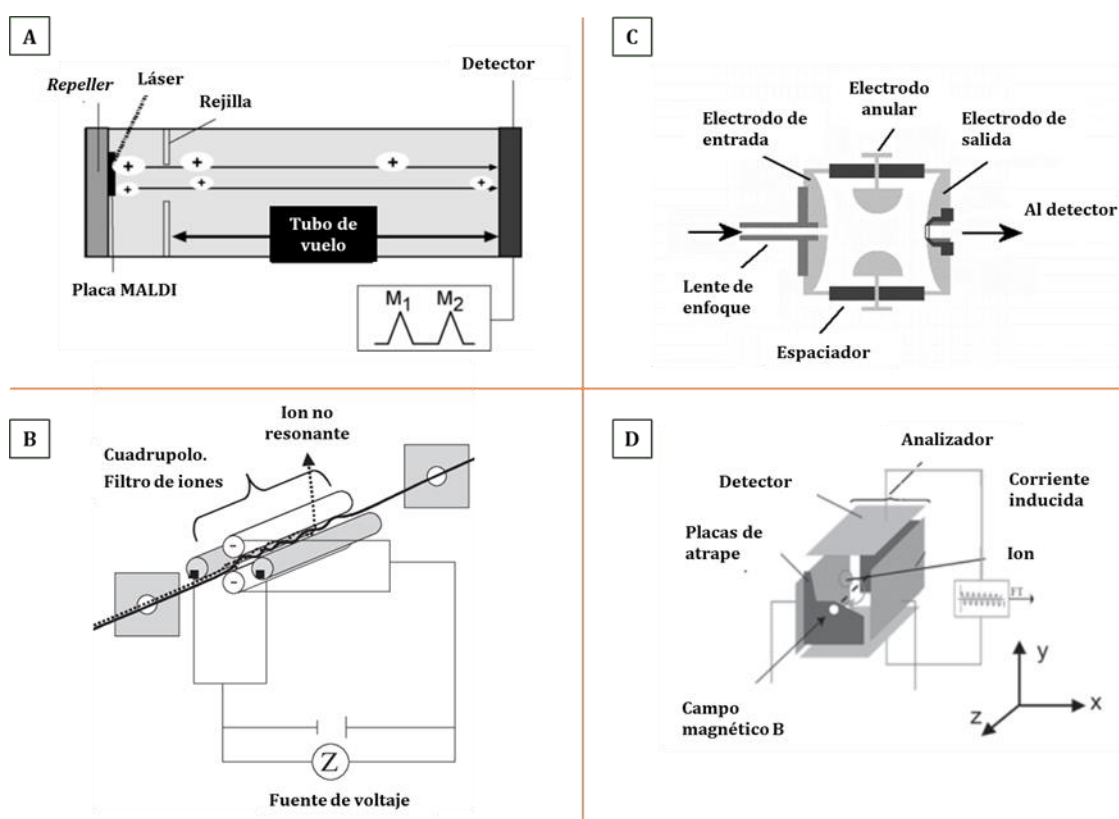


Figura 48. Analizadores de masas más comunes. A: TOF, B: Q, C: IT, D: FT-ICR [289].

Las combinaciones de analizadores de MS han adquirido especial importancia ya que facilitan la identificación de compuestos realizando MS^n y aumentan la sensibilidad enormemente. Entre las combinaciones más utilizadas se encuentran Q-TOF, Q-Trap y QQQ. Este último sistema híbrido es muy utilizado en estudios de metabolómica dirigida, ya que puede trabajar en modo MRM, *scan* general en Q1 y *scan* de los

fragmentos en Q3. El esquema de un triple cuadrupolo se representa en la **Figura 49**. El modo MRM es el método de adquisición de datos más utilizado por su selectividad y sensibilidad, ya que, al centrarse sólo en las moléculas de interés, elimina los posibles interferentes de la matriz y alcanza los niveles de detección de ultratrazas. Este modo de adquisición consiste, brevemente, en seleccionar en el primer cuadrupolo la masa de la molécula de interés que, tras ser fragmentada en el segundo cuadrupolo, que actúa como celda de disociación inducida por colisión (CID), da lugar a los fragmentos característicos, analizados en el tercer cuadrupolo. Tras este modo de análisis se generan las transiciones MRM características del compuesto de interés y utilizadas generalmente para estudios cuantitativos. Además, este analizador está generalmente acoplado a la fuente de ionización ESI y a las técnicas de separación cromatográficas de HPLC y de ultra-alta resolución (UPLC) [293].

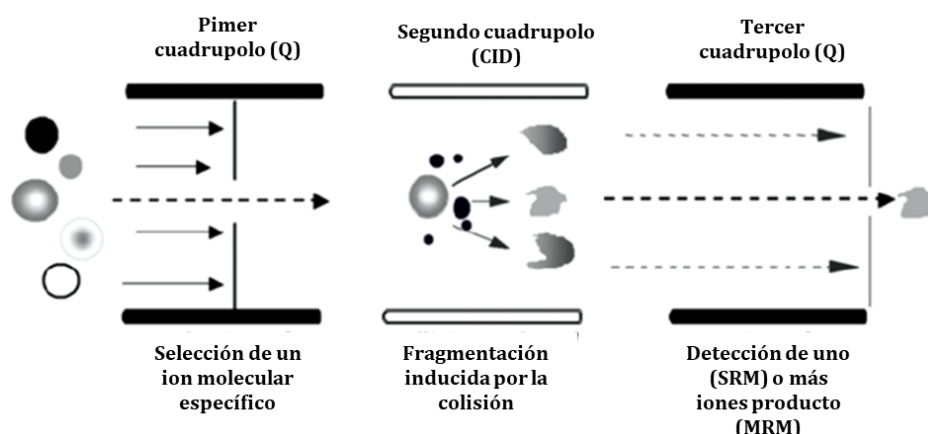


Figura 49. Esquema de un analizador de triple cuadrupolo, mostrando el modo de trabajo MRM.

I. 6. c Detectores

El detector es el encargado de medir la abundancia de los iones, separados en el analizador, como una señal eléctrica. Existen diferentes tipos de detectores, entre los que se encuentran el multiplicador de electrones (multiplicador de electrones en

canales), placa de microcanales (MCP), la copa de faraday, el contador de centelleo, contador de fotones multipixel, etc. [294,295].

El detector más utilizado en equipos de espectrometría de masas es el multiplicador de electrones, que amplifica la débil señal del haz de iones produciendo ganancias de 10^6 órdenes de magnitud. El principio básico, por el cual se produce esta amplificación, es la capacidad de que un ion cargado, al golpear contra una superficie, genere iones secundarios que se liberan de los átomos localizados en la capa externa de dicha superficie. Existen dos tipos dentro de estos detectores, el de dínodo discreto y el continuo o multiplicador de electrones en canales. La principal diferencia se encuentra en el hecho de que, este último detector, no tiene múltiples dínodos individuales, sino que está formado por un tubo de vidrio en forma de corneta, a veces terminado en forma de espiral o caracol, cuyo interior está recubierto por un óxido de plomo semiconductor. Además, estos detectores de dínodos continuos pueden alcanzar, en determinados casos, ganancias de 10^8 y son fácilmente miniaturizables [294,295].

El detector MCP, que posee el mismo principio básico que los multiplicadores de electrones, está siendo muy utilizado en combinación con analizadores de TOF [296]. La principal ventaja que este detector proporciona, es una mayor resolución espacial, debida a que posee múltiples canales separados [297].

I. 7 Proteómica cuantitativa

Las técnicas de proteómica cuantitativa permiten la comparación, a nivel de contenido proteico, de dos estados diferentes, como pueden ser células procedentes de un tejido sano vs. células procedentes de un tejido enfermo, células tratadas con un determinado fármaco vs. células sin tratar, células expuestas a un determinado tóxico vs. células en condiciones normales, etc. Mediante la identificación y cuantificación de proteínas, diferencialmente expresadas entre dichos estados, podremos afirmar qué proteínas se encuentran desreguladas. Este grupo de proteínas alteradas estarán probablemente implicadas en el proceso objeto de estudio (enfermedad, tratamiento farmacológico, toxicidad de un determinado compuesto, etc.), y será ese proceso el causante o la

consecuencia de dicha desregulación. Por otra parte, proteínas cuya abundancia no se modifique, podrán ser descartadas, ya que probablemente no estarán involucradas en el proceso que estemos estudiando. El conjunto de proteínas desreguladas identificadas constituirá la clave para un mejor entendimiento e interpretación del mecanismo molecular implicado en el proceso estudiado [298]. Esta cuantificación puede ser absoluta o relativa; a continuación se explican las características más relevantes de cada una de ellas, la comparación de ambos grupos de métodos puede observarse en la **Figura 50**.

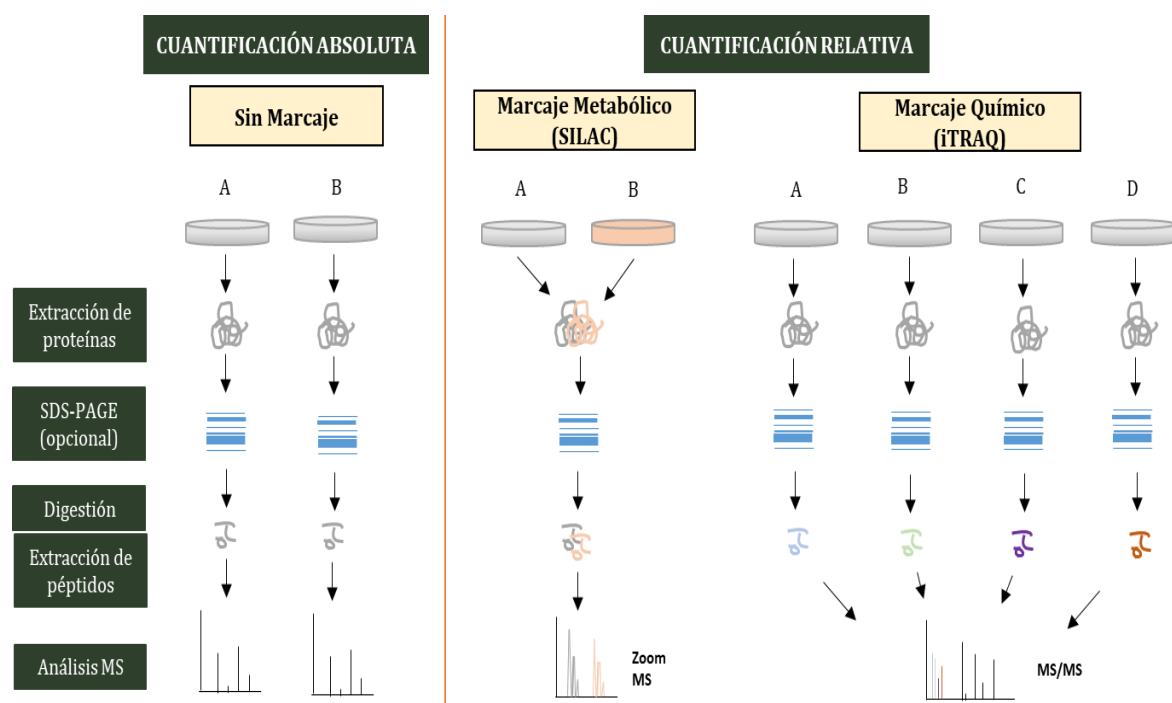


Figura 50. Representación del procedimiento de las estrategias de análisis de proteómica cuantitativa absoluta y relativa; así como la comparación de las dos técnicas de cuantificación relativa más relevantes: SILAC (marcaje metabólico) y iTRAQ (marcaje químico).

I. 7. a Cuantificación absoluta: sin marcaje

La cuantificación absoluta se realiza mediante la mezcla de una cantidad conocida del patrón, marcado con isótopos, con el analito, que se introduce en el espectrómetro de

masas. La cantidad absoluta del analito se calcula a partir de la relación de intensidad de iones entre el analito y su estándar. En el caso de estudios de proteómica, debido al gran número de analitos de interés, esto carece de sentido, por lo que generalmente se recurre a métodos que no requieren de este patrón marcado isotópicamente [299]. La alternativa a estos análisis incluye mediciones de intensidades de pico espectral de masa y recuento espectral, y son altamente dependientes de la reproducibilidad del instrumento de medida. Mientras que las intensidades de los iones peptídicos pueden correlacionarse con abundancias de proteínas, los métodos de conteo espectral estiman la abundancia de proteínas comparando el número de espectros MS/MS asignados a cada proteína, basándose en la suposición de que el número de péptidos observados de una proteína se correlaciona con su abundancia. Esto se ha implementado en varios métodos de conteo espectral: índice de abundancia de proteína (PAI), proteína absoluta expresión (APEX), índice de abundancia de proteína modificada exponencialmente (emPAI), factor de abundancia espectral normalizado (NSAF), índice espectral normalizado (SIN) [300].

Los dos primeros métodos son los más utilizados y, a continuación, se describen brevemente sus fundamentos teóricos: el método de cuantificación APEX correlaciona los recuentos espectrales obtenidos a partir de datos de MS con predicciones computacionales de péptidos proteotípicos para cada proteína. De esta forma APEX estima la concentración absoluta de las proteínas, con gran exactitud, frente a la concentración total de proteína y todos los péptidos proteotípicos [301]. El método emPAI se basa en la comparación del número de péptidos observados experimentalmente y número de péptidos observables calculado. Este método presenta mayor reproducibilidad con respecto al método APEX pero menor exactitud, además es muy sencillo de implementar ya que el motor de búsqueda Mascot incorpora el valor emPAI en los resultados [300].

I. 7. b Cuantificación relativa: con marcaje isotópico

La cuantificación relativa de proteínas se basa en la comparación de dos poblaciones o muestras diferencialmente marcadas con isótopos estables [299].

Se han desarrollado varios métodos para incorporar isótopos marcados a las proteínas de interés, que incluyen el marcaje químico y el marcaje metabólico. El marcaje metabólico requiere la adición de un elemento isotópico (por ejemplo, ^{13}C , ^{15}N o ^{18}O en sales o amino ácidos) a los medios de crecimiento, en una forma que lo hace disponible para su incorporación en todo el organismo, tejido o célula. Por otro lado, el marcaje químico se produce después de la extracción de proteínas y, por lo tanto, es completamente independiente de la fuente y la preparación de la muestra. Este marcaje químico tiene la ventaja de que prácticamente cualquier tipo de muestra biológica puede ser marcada, incluidos los tejidos humanos o fluidos corporales. Además, el tiempo necesario para este tipo de marcaje es, en general, mucho más corto que cuando se incorpora metabólicamente, donde puede llevar semanas la realización del marcaje completo. Sin embargo, la gran ventaja del marcaje metabólico se observa claramente en el procedimiento de tratamiento de las muestras en la **Figura 50**, mientras que en el marcaje químico las poblaciones a comparar se tratan como muestras individuales hasta casi el análisis de las mismas, en el marcaje metabólico se procesan ambas poblaciones como una sola, tras la extracción de las proteínas de las muestras biológicas [302,303]. Este hecho se traduce en una mayor exactitud y reproducibilidad del análisis, ya que las variaciones observadas entre poblaciones diferentes, no van a verse influenciadas por posibles variaciones en el tratamiento de la muestra [298]. Las principales técnicas de marcaje químico son ICAT y iTRAQ mientras que SILAC es la técnica de marcaje metabólico por excelencia.

I. 7. b. i Marcaje químico

La técnica ICAT se basa en la purificación de proteínas, cuyas cisteínas son previamente marcadas, mediante columnas inmovilizadas de avidina. El reactivo ICAT contiene biotina, para la interacción con avidina, un grupo de yodoacetamida, para el acoplamiento con residuos de cisteína reducidos y un espaciador, marcado con variantes isotópicas ligeras (por ejemplo, hidrógeno) o pesadas (por ejemplo, deuterio). Una vez realizado el marcaje se mezclan las poblaciones equitativamente para realizar el análisis. Con este método se marcan exclusivamente los residuos de

cisteína, por lo tanto, las proteínas libres de este aminoácido que representan aproximadamente el 20% del proteoma, se excluyen del análisis [298].

El marcaje isobárico iTRAQ se basa en la utilización de isótopos que se unen covalentemente al extremo N-terminal y a las aminas de cadenas laterales y, por lo tanto, son adecuadas para la determinación simultánea de proteínas independientemente de la presencia de residuos de cisteína. En este tipo de ensayos se produce el marcaje con hasta cuatro isótopos isobáricos formados por: un extremo reactivo al amino, un balanceador y un ion reportero que tendrá m/z de 114, 115, 116 y 117. La cuantificación relativa de este tipo de marcaje se realiza con la intensidad de los iones reportero obtenidos de los espectros de MS/MS [298], su procedimiento experimental se muestra en la **Figura 50**.

I. 7. b. ii Marcaje metabólico

La estrategia bioanalítica denominada SILAC es una técnica de marcaje metabólico, cuyo procedimiento experimental general consiste principalmente en cultivar dos poblaciones celulares, A y B, en medios idénticos, excepto por la sustitución de una serie de aminoácidos (aa), en uno de los medios, por su versión “pesada”, es decir, un aa en el que los átomos de ^{12}C se sustituyen por ^{13}C , los de ^{14}N por ^{15}N , o ambos. La incorporación de los aminoácidos “pesados”, principalmente L-lisina y L-arginina, a las proteínas de las células se realiza de forma metabólica, de manera que tras 5-6 duplicaciones de la población celular, se consigue obtener una eficacia de marcaje del 100% [302,303]. De este modo, se obtiene una población B donde todas las proteínas están marcadas isotópicamente con uno o varios aa “pesados” frente a una población A donde todas las proteínas poseen todos sus aa en su forma natural “ligera”. Una vez marcadas, las dos poblaciones se mezclan en relación 1:1 y se prosigue con el proceso analítico (**Figura 50**), el cual incluye etapas de separación de las proteínas mediante electroforesis en gel y de digestión de las mismas con una enzima proteolítica, generalmente tripsina, dando lugar a una mezcla de péptidos “ligeros” (procedentes de la población A) y “pesados” (procedentes de la población B) dentro de la misma muestra. Para cualquiera de estos péptidos, su forma “ligera” y “pesada” son

químicamente idénticas excepto por el átomo pesado, por lo que poseen un comportamiento cromatográfico idéntico y se van a detectar mediante espectrometría de masas de forma simultánea. Como resultado, en el espectro de masas, cada péptido detectado aparecerá como un doblete, consecuencia de la diferencia isotópica, pudiéndose relacionar la intensidad relativa de cada uno de los dos picos (correspondientes a la forma ligera y pesada del péptido) en el espectro de MS con la abundancia relativa de la proteína a la cual pertenece dicho péptido en las poblaciones A y B.

Simultáneamente a la cuantificación mediante el espectro de MS, se realiza una identificación mediante los espectros de MS/MS de cada péptido. La situación ideal es que todos los péptidos identificados puedan ser cuantificados y para ello es necesario que posean uno de los aa marcados en su secuencia. Esta es la razón principal por la que en la mayoría de experimentos SILAC, los aa marcados utilizados sean Lys y Arg y la enzima utilizada para digerir las proteínas sea tripsina, ya que con esto se asegura que todos los péptidos generados en la digestión van a tener en su C-terminal una Lys o una Arg (marcada o sin marcar dependiendo de la población de la que procedan), consiguiéndose, por tanto, que todos los péptidos identificados sean también cuantificados. Para cada proteína cuantificada se obtendrá un R_{SILAC} con la **Ecuación 2**, detallada en el epígrafe de materiales y métodos de esta Tesis Doctoral. Cuando una proteína presente un $R_{SILAC} = 1$, nos encontraremos ante una proteína cuya abundancia relativa es la misma en las dos poblaciones celulares, o lo que es lo mismo, una proteína cuya expresión no se ha visto modificada entre los dos estados estudiados. Proteínas cuyo cociente SILAC sea $1 > R_{SILAC} > 1$ representarán proteínas cuya abundancia entre los dos estados será diferente y, por tanto, se tratará de proteínas implicadas en el proceso objeto de estudio.

El estudio de modelos animales es esencial para entender mejor el efecto tóxico de un compuesto o una enfermedad, por lo que el estudio del proteoma de un sistema *in vivo* se convierte en una necesidad en muchas ocasiones. Se han realizado trabajos de marcaje metabólico de moscas y gusanos marcados con *Escherichia coli* y levaduras respectivamente, ambas marcadas con ^{15}N [304] y ratones alimentados con $^{13}C_6$ -lisina [305,306]. Sin embargo, esta metodología es costosa, el marcaje completo del individuo

requiere mucho tiempo y no puede aplicarse a humanos. Es por ello que se ha desarrollado una variante del SILAC, conocida como super-SILAC, la cual se basa en el uso de una mezcla de diferentes líneas celulares representativas del tejido que se quiere estudiar. Esta mezcla de células se empleará como patrón interno tanto con el tejido control como con el tejido tratado, de forma que, en definitiva, compararemos las proteínas de ambos tejidos. Esta técnica se ha utilizado satisfactoriamente con diferentes tejidos, demostrando su aplicabilidad [42,307,308]. El análisis de las muestras se realiza mediante espectrometría de masas, de forma similar que para la técnica SILAC. De forma análoga al experimento SILAC se obtiene un $R_{\text{super-SILAC}}$ para cada proteína cuantificada, utilizando para ello las **Ecuaciones 2, 3 y 4** detalladas en el epígrafe de materiales y métodos de esta Tesis Doctoral.

I.8 Metabolómica

El primer paso para llevar a cabo un experimento de metabolómica es determinar el número de metabolitos que se quiere medir. En algunos casos puede ser de interés examinar un conjunto definido de metabolitos mediante un análisis dirigido, típicamente de una o más rutas metabólicas de potencial interés. Las técnicas de resonancia magnética son muy utilizadas para los análisis de metabolómica dirigida, sin embargo, la técnica por excelencia es la espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo trabajando en modo MRM por su sencillez y elevada sensibilidad. En otros casos, un análisis abierto o no dirigido puede ser más idóneo, ya que tiene como objetivo medir y comparar, entre muestras, tantos metabolitos como sea posible. En última instancia, el número y las propiedades químicas de los metabolitos estudiados son atributos de cualquier experimento metabolómico, que determinan el diseño experimental, condicionando la elección de la preparación de la muestra y la configuración instrumental [309,310].

Cualquier ensayo de metabolómica consta de dos etapas: quenching y extracción de los metabolitos. En el caso de emplear la cromatografía de gases es obligatorio incluir otra etapa más de derivatización de los analitos. Estas etapas se describen, brevemente, a continuación:

- Quenching. Esta es una primera etapa fundamental para la obtención de resultados que reflejen fielmente el perfil metabólico de la célula. La finalidad de este proceso es la de “congelar” las rutas metabólicas para preservar la integridad de los diferentes compuestos y evitar su degradación por vías enzimáticas [311]. Generalmente, se emplean diferentes métodos que implican la disminución de la temperatura de la muestra, ralentizando e incluso deteniendo las reacciones metabólicas antes de proceder con la lisis celular y extraer los metabolitos.
- Extracción. En la bibliografía existen múltiples combinaciones de diferentes disolventes orgánicos con agua. Habitualmente se utiliza la combinación de metanol, cloroformo y agua, que permite una extracción líquido-líquido con separación de fases polar (metanol y agua) y apolar (cloroformo). El empleo de esta mezcla de disolventes permite la extracción de los metabolitos y la precipitación de las proteínas y otros restos celulares en la interfase [311].
- La derivatización. Es una técnica empleada para aumentar la volatilidad de los compuestos, facilitando su determinación por cromatografía de gases. La vía principal para este objetivo es la trimetilsililación de los analitos. Uno de los reactivos más empleados para la derivatización es la BSTFA, junto con el TMCS que actúa como catalizador de la reacción. Este derivatizante actúa sustituyendo los hidrógenos activos de una gran variedad de compuestos (ácidos, alcoholes, aminas, etc.) por grupos trimetilsililo (TMS). Sin embargo, es necesario llevar a cabo una reacción previa a la trimetilsililación para proteger los grupos carbonilo de aldehídos y cetonas de azúcares reductores, de procesos de ciclación, así como estabilizar α -cetoácidos frente a la descarboxilación. Con esto se mejora la eficiencia de la trimetilsililación, de forma que no se produce la introducción de los grupos TMS en posiciones distintas de un mismo compuesto, lo que provocaría la formación de especies con diferente volatilidad a partir de un mismo compuesto y la aparición de varios picos cromatográficos que deberían corresponder con un solo analito. El reactivo más empleado en las publicaciones es el hidrocloreuro de metoxiamina disuelto en piridina [312,313].

Ambas reacciones de derivatización se representan por orden de utilización en la **Figura 51**.

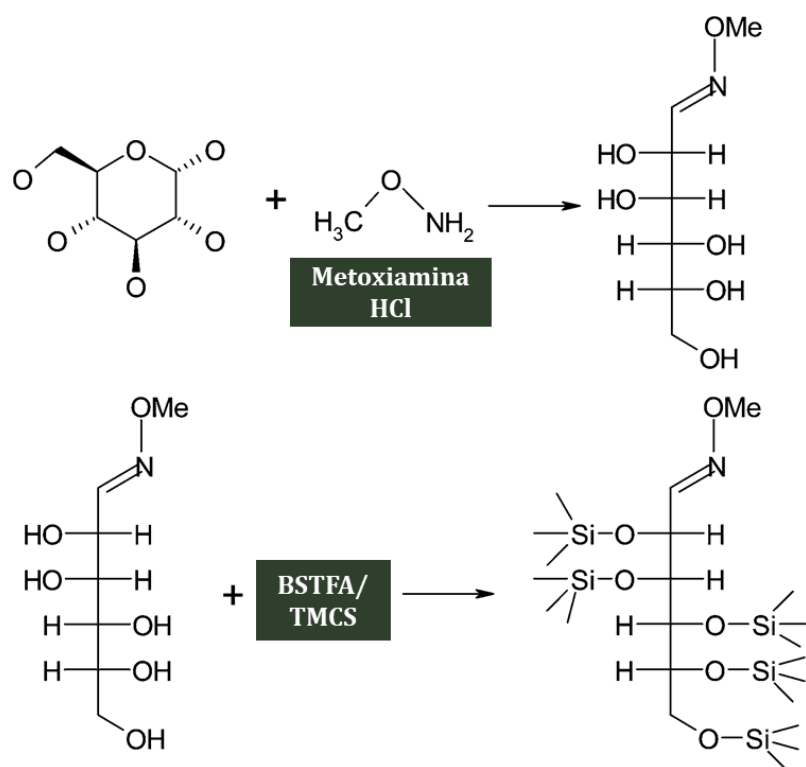


Figura 51. Reacciones de derivatización realizadas para volatilizar compuestos por orden de utilización.

ANEXO II. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

II. 1 Artículos científicos derivados directamente de la Tesis Doctoral

C. Nerín, E. Canellas, P. Vera, E. García-Calvo, J.L. Luque-García, C. Cámara, R. Ausejo, J. Miguel, N. Mendoza, A common surfactant used in food packaging found to be toxic for reproduction in mammals, *Food Chem. Toxicol.* 113 (2018) 115–124. doi:10.1016/j.fct.2018.01.044.

E. García-Calvo, P. Cabezas-Sanchez, J.L. Luque-García, SILAC-based quantitative proteomics for assessing the toxicity induced by CdSe/ZnS quantum dots, *Nanotoxicology* (2019). En revisión.

E. García-Calvo, J.L. Luque-García, Analysis of protein expression in developmental toxicity induced by CdSe/ZnS in zebrafish, *Chemosphere* (2019). Enviado para su publicación.

E. García-Calvo, A. Machuca, C. Nerín, N. Rosales-Conrado, J.L. Luque-García, Untargeted and targeted mass spectrometry-based metabolomics provide novel insights into the potential toxicity associated to a common surfactant used in food packaging, *Archives of Toxicology* (2019). Enviado para su publicación.

E. García-Calvo, C. Rolando, M.L. Mena, J.L. Luque-García, Combination of untargeted and targeted metabolomics for the elucidation of the protective role of Se(IV) against MeHg-induced toxicity, (2019). En preparación.

II. 2 Otros artículos científicos

M. D. Jiménez-Antón, E. García-Calvo, C. Gutiérrez, M. D. Escribano, N. Kayali, J. L. Luque-García, A. I. Olías-Molero, M. J. Corrala, M. P. Costif, J. J. Torrado, J. M. Alunda, Pharmacokinetics and disposition of miltefosine in healthy mice and hamsters experimentally infected with *Leishmania infantum*, *Eur. J. Pharm. Sci.* 121 (2018) 281-286. doi: 10.1016/j.ejps.2018.06.002.

J. Tomé-Carneiro, M.C. Crespo, E. García-Calvo, J.L. Luque-García, A. Dávalos, F. Visioli, Proteomic evaluation of mouse adipose tissue and liver following hydroxytyrosol supplementation, *Food Chem. Toxicol.* 107 (2017) 329–338. doi:10.1016/j.fct.2017.07.009.

P. Cabezas-Sánchez, E. García-Calvo, C. Cámara, J.L. Luque-García, A quantitative proteomic approach for unveiling novel mechanisms associated with MeHg-induced toxicity: Effects on the methylation cycle, *Toxicol. Res. (Camb)*. 5 (2016) 291–302. doi:10.1039/c5tx00354g.

J. Alfonso-Garrido, E. García-Calvo, J.L. Luque-García, Sample preparation strategies for improving the identification of membrane proteins by mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (17) (2015) 4893-4905. doi:10.1007/s00216-015-8732-0.

II. 3 Capítulos de libro

R.C. Prados-Rosales, G. Aragonese-Cazorla, H. Estevez, E. Garcia-Calvo, A. Machuca and J.L. Luque-Garcia, Strategies for Membrane Protein Analysis by Mass Spectrometry, *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*, capítulo 16 (2019) 289-298. doi: 10.1007/978-3-030-15950-4_16.

II. 4 Comunicaciones a congresos

E. García-Calvo, A. Machuca, N. Rosales, E. Canellas, P. Vera, C. Nerín, J.L. Luque-García, A multi-omic approach reveals the biomolecular mechanisms associated to the toxicity of a common surfactant used in food packaging. XXII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica, Valladolid (España) 2019. *Comunicación Oral*.

E. Cepriá, H. Estévez, E. García-Calvo, J. L. Luque-García. "Untargeted metabolomics analysis reveals key pathways responsible for antitumoral properties of selenium nanoparticles". XXI Reunión de la Sociedad Española de química analítica. Valencia (España), 2017. *Póster*.

E. García-Calvo, J.L. Luque-García. "From *in vitro* to *in vivo* model system for elucidating the molecular mechanism of toxicity of CdSe/ZnS QDs". 6th Euchems. Sevilla (España), 2016. *Comunicación Oral*.

H. Estévez, Mecha, M., E. García-Calvo, C. Guaza, J. L. Luque-García. "Unveiling multiple sclerosis: a proteomic study of the role of key proteins in m1 and m2 phenotypes". 6th Euchems. Sevilla (España), 2016. *Póster*.

J. L. Luque-García, J. Espadas-Moreno, H. Estévez, M. N. Fernandez-Muñiz, E. García-Calvo, C. García-Lidón, S. Montalvo-Qurós, C. Cámara. "(BIO)Analytical strategies for assesing nanoparticles toxicity". XXI Reunión de la Sociedad Española de química analítica. Santiago de compostela (España), 2015. *Comunicación Oral*.

E. García-Calvo, C. Cámara, J.L. Luque-García. "Quantitative proteomics for evaluating the potential toxicity of CdSe/ZnS QDs". 14as Jornadas de Análisis Instrumental. Barcelona (España), 2014. *Comunicación Oral*.

E. García-Calvo, J. Espadas-Moreno, C. Cámara, J. L. Luque-García. "Analysis of electroblotted proteins by mass spectrometry: A new tool for membrane protein research". XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica. Úbeda (España), 2013. *Póster*.

